

Université Claude Bernard Lyon I

FACULTE DE MEDECINE LYON - SUD

Année 1980 N° 204

**Immunoprécipitation - ou Immuno-empreinte -
après Focalisation iso-électrique :
Applications à l'étude du Polymorphisme
& de la Micro-hétérogénéité de quelques Protéines humaines.**

Thèse soutenue publiquement le 29 mai 1980
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Alain Francina

né le 24.XII.1945

à Evian les Bains (Haute-Savoie)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553407_0031

Université Claude Bernard Lyon I

FACULTE DE MEDECINE LYON - SUD

Année 1980 N° 204

**Immunoprécipitation - ou Immuno-empreinte -
après Focalisation iso-électrique :
Applications à l'étude du Polymorphisme
& de la Micro-hétérogénéité de quelques Protéines humaines.**

Thèse soutenue publiquement le 29 mai 1980

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Alain Francina

né le 24.XII.1945

à Evian les Bains (Haute-Savoie)

Immunoprecipitation en immun-enzyme
après fixation iso-électrique
Application à l'étude de l'enzyme
de la cellule - *Streptococcus pyogenes*



Président : Mr D. GERMAIN, Professeur

Premier Vice-Président : Mr DUFAY, Professeur

Deuxième Vice-Président : Mr DUPLAN, Maître Assistant

Troisième Vice-Président : Mlle A. ECHALLON, Etudiante

Secrétaire général de l'Université : Mr J. RAMBAUD, Administrateur civil

Unités d'Enseignement et de Recherche (U.E.R.)

U.E.R. FACULTE DE MEDECINE GRANGE-BLANCHE	Mr P. ZECH, Professeur
U.E.R. FACULTE DE MEDECINE ALEXIS CARREL	Mr R. MORNEX, Professeur
U.E.R. DE MEDECINE LYON NORD	Mr Y. MINAIRE, Maître de Conférences Agrégé
U.E.R. FACULTE DE MEDECINE LYON SUD	Mr J. NORMAND, Professeur
U.E.R. FACULTE DE PHARMACIE	Mr C.A. BIZOLLON, Professeur
U.E.R. FACULTE DES TECHNIQUES DE READAPTATION	Mr A. MORGON, Professeur
U.E.R. DE BIOLOGIE HUMAINE	Mr J.P. REVILLARD, Maître de Conférences Agrégé
U.E.R. E.P.S.	Mr A. MILLON, Professeur d'E.P.S.
U.E.R. FACULTE D'ODONTOLOGIE DE LYON	Mr J. PARRET, Professeur
U.E.R. DE MATHÉMATIQUES	Mr P. PICARD, Professeur
U.E.R. DE PHYSIQUE	Mr J. DELMAU, Professeur
U.E.R. FACULTE DE CHIMIE ET DE BIOCHIMIE	Mme A. VARAGNAT, Maître Assistant
U.E.R. FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE	Mr Y. LENOIGNE, Professeur
U.E.R. FACULTE DE SCIENCES PHYSIOLOGIQUES	Mlle J.F. WORÉE, Professeur
U.E.R. DE PHYSIQUE NUCLEAIRE	Mr M. GUSAKOW, Professeur
U.E.R. DE MECANIQUE	Mlle G. COMTE-BELLOT, Professeur
U.E.R. OBSERVATOIRE DE LYON	Mr G. MONNET, Astronome Adjoint
U.E.R. I.U.T. 1	Mr A. VILLE, Professeur
U.E.R. I.U.T. 2	Mr J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

A ma mère,
en témoignage de mon profond attachement
et de ma sincère reconnaissance.

A la mémoire de mon père,

A toute ma famille.

A notre Maître et Président de Thèse,
monsieur le Professeur R. Creyssel,

Nous le remercions de nous avoir accepté
dans son Laboratoire hospitalier - universitaire
et de nous avoir permis de mener des recherches
sur les gammopathies.

Nous avons été séduit par l'étendue de
ses connaissances en biochimie clinique. Ses conseils
ont toujours été très précieux et utiles.

Qu'il veuille bien trouver ici
l'expression de notre reconnaissance.

Nous tenons également à souligner sa simplicité,
qui fait de son Service, un Service accueillant,

Nous lui en savons gré.

A nos Juges

Monsieur le Professeur M. Carraz ,

Nous le remercions d'avoir bien voulu être
notre juge malgré son emploi du temps très chargé.

Cet ouvrage lui semblera modeste compte tenu
de l'étendue de ses connaissances ,
nous sommes très honoré de sa présence .

Qu'il trouve ici le témoignage
de notre reconnaissance
et de nos sentiments très respectueux .

Monsieur le Professeur J. P. Reboud ,

Il nous a fait l'honneur d'accepter de juger
notre travail.

Nous espérons que celui-ci le satisfera
et que sa critique ne sera pas trop sévère
à notre égard.

Nous comptons sur son indulgence.

Monsieur le Professeur M. Dechavanne, MCA,

Sa gentillesse habituelle nous permet
de le compter parmi nos juges,
ce dont nous lui sommes reconnaissant,
osant espérer qu'il trouvera dans ce travail
un modeste appoint aux méthodes actuelles
d'étude des protéines.

Monsieur le Professeur J. Delaunay, MCA,

Nous sommes heureux qu'il ait accepté
de faire partie de notre Jury

et l'en remercions très vivement.

A monsieur le Docteur Philippe Arnaud,
pour les manipulations qu'il nous a suggérées,
pour les discussions fructueuses
que nous avons eues avec lui . . .

A madame le Docteur Colette Chapuis-Cellier,
qui nous a grandement aidé
dans l'élaboration de ce travail . . .

A madame Denise Baumstümmler,
car elle nous a toujours épaulé
dans la réalisation technique
des méthodes électrophorétiques
et immuno-électrophorétiques . . .

qu'ils trouvent ici
l'expression de ma profonde reconnaissance .

Chapitre I

Rappel sur les Principales Méthodes
Electrophorétiques et Immuno-électrophorétiques
de Séparation et de Détection des Protéines

S o m m a i r e	pages :
I. Les Méthodes électrophorétiques	<u>texte</u> 3
I.1. Electrophorèse sur Acétate de Cellulose (T.I)	19
I.2. Electrophorèse en Gel d'Amidon	
I.3. Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide	
I.3.1 : Gel de polyacrylamide Agarose	20
I.3.2 : Gel en gradient de polyacrylamide	23
I.3.3 : Gel de polyacrylamide (T.IV.)	24
avec Agents dénaturants des protéines	
I.3.4 : Gel en gradient de polyacrylamide	
avec Agents dénaturants des protéines	
I.3.5 : Electrofocalisation analytique	26
I.3.6 : Electrophorèse bidimensionnelle	5 & 6
II. Les Méthodes Immuno-électrophorétiques	<u>texte</u> 7
II.1. L'Immuno-électrophorèse	
II.2. L'Immuno-électrophorèse quantitative	
II.3..L'Immuno-électrophorèse associée :	
l'électrophorèse bidimensionnelle,	
ou Immuno-électrophorèse croisée (T.VI.)	28
III. Les Méthodes de Détection des Protéines	<u>texte</u> 9
après Electrophorèse	
III.1. Les méthodes de détection non spécifiques	
III.2. Les méthodes de détection spécifique	
du type de protéines	
III.3. Les méthodes de détection spécifique	
d'une protéine donnée	<u>texte</u> 11
III.3.1. Détection des Enzymes	
III.3.2. Détection des Substances Antigéniques	
Méthodes Immunochimiques :	
Immunoprécipitation (T.VII)	30,31,32
Immuno-Empreinte (T.VIII)	33
III.3.3. Détection des Substances	
Radio-actives	
Annexe : Tableaux I. à VIII.	16
Bibliographie (23 références)	35

I. Les Méthodes électrophorétiques

En biochimie clinique l'électrophorèse représente l'une des méthodes d'analyse les plus couramment employées. Elle peut se pratiquer sur différents supports et les conditions de migration peuvent varier considérablement d'une technique électrophorétique à une autre.

Les différentes électrophorèses réalisées en pratique courante au Laboratoire sont présentées Tableaux I à V
(page

I.1. Electrophorèse sur Acétate de Cellulose (Tableau I)

Elle constitue la première des techniques utilisées pour l'étude des protéines sériques. Elle permet une quantification des principaux groupes de protéines du sérum.

I.2. Electrophorèse en Gel d'Amidon

Elle est moins utilisée actuellement, progressivement remplacée par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

I.3. Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide comporte de nombreuses variantes. Elle peut se réaliser en

* I.3.1. Gel de Polyacrylamide Agarose (Tableau II)

Cette électrophorèse représente une méthode de choix pour l'étude qualitative des protéines sériques et urinaires.

* I.3.2. Gels en Gradients de Polyacrylamide (Tableau III)

La teneur du gel en acrylamide varie d'une manière continue d'un point du gel à l'autre, dans le sens longitudinal.

Ces gels peuvent être soit préparés au laboratoire (1) mais leur réalisation est délicate, soit commercialisés tels les gels PHARMACIA par exemple qui se présentent en 4,9 x 82 x 82 mm avec des gradients d'acrylamide 4 / 30 % ou 2 / 16 %.

Le gradient augmente considérablement le pouvoir séparateur des gels d'acrylamide : chaque protéine est triée suivant sa charge et selon sa taille.

• I.3.3. Gels de polyacrylamide et Agents dénaturants (Tableau IV)

L'électrophorèse en gel de Polyacrylamide Agarose peut être réalisée en présence d'un agent dénaturant des protéines. L'agent dénaturant utilisé le plus fréquemment est un détergent anionique, le Dodécyl Sulfate de Sodium ou "SDS" des auteurs anglo-saxons (2,3).

D'autres agents dénaturants ou solubilisants ont été étudiés : milieu urée à forte molarité ; mélange phénol : acide acétique : eau ; détergents neutres : TRITON X100 , BRIJ 35 (4) , etc.

Le "SDS", par sa charge anionique, s'associe aux protéines à séparer. La migration de celles-ci dépend alors, pour un gel de porosité donnée, de leur taille. La détermination des poids moléculaires des protéines est possible par étalonnage interne.

L'électrophorèse en présence d'agents solubilisants et/ou dénaturants constitue en biochimie clinique une méthode de choix dans l'étude des protéinuries (5,6,7). La différenciation du caractère glomérulaire ou/et tubulaire des protéinuries, l'établissement du degré de sélectivité des protéinuries glomérulaires peuvent être obtenus par électrophorèse en gels de polyacrylamide agarose SDS. Une limite à cette méthode est qu'en présence d'agents dissociants comme le SDS, les protéines composées de plusieurs sous-unités non covalentiellement liées se dissocient et peuvent entraîner une surestimation du nombre des constituants protéiques lors de l'interprétation de l'électrophorèse.

• I.3.4. Gels en Gradient de Polyacrylamide avec Agents dénaturants

Cette méthode électrophorétique constitue en quelque sorte une variante combinant les deux techniques précédentes.

• I.3.5. Focalisation iso-électrique sur gel en couche mince de polyacrylamide (Tableau V)

Cette technique électrophorétique constitue la méthode la plus résolutive pour l'analyse d'un mélange de protéines.

• I.3.6. Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide associée à une autre technique : électrophorèse bidimensionnelle

De nombreuses méthodes électrophorétiques en deux dimensions ont été décrites. Nous ne retiendrons que les principales.

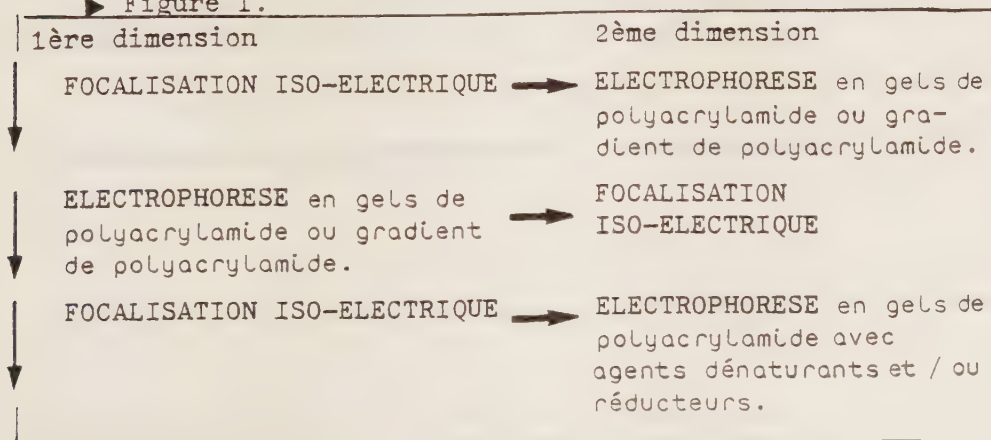
I.3.6.1) Electrophorèse en gel d'acrylamide bidimensionnelle ou Focalisation iso-électrique en deux dimensions

Cette méthode a surtout été utilisée pour tester la reproductibilité de la méthode électrophorétique et, également, pour étudier la conformation de protéines ou la micro-hétérogénéité de celles-ci (10).

I.3.6.2) Focalisation iso-électrique et Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

Pour résumer les différentes possibilités de cette technique bidimensionnelle, nous présentons ci-après, les méthodes électrophorétiques pratiquées dans l'une ou l'autre dimension.

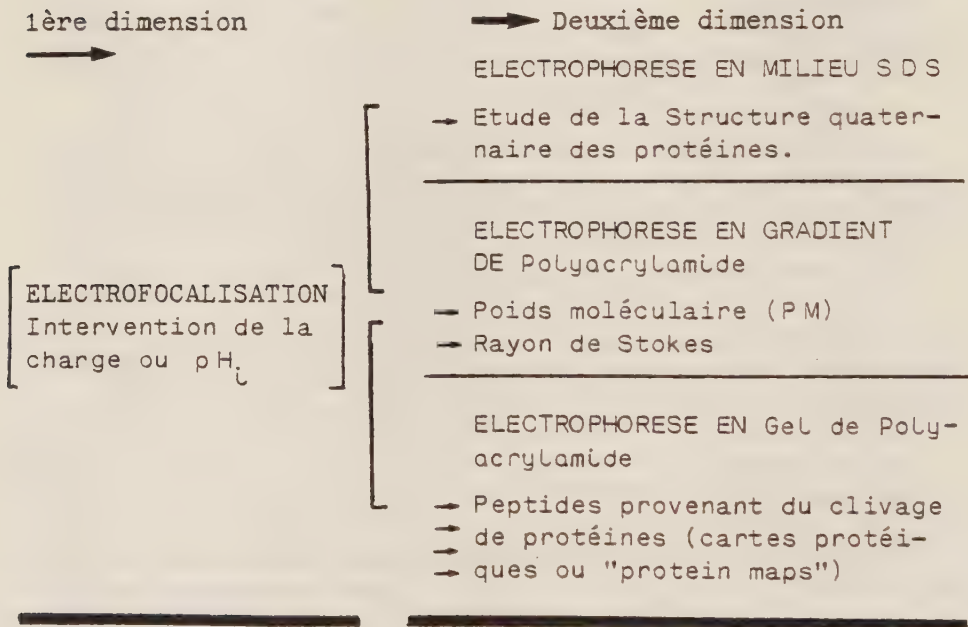
► Figure 1.



Dans cette Figure 1. chaque combinaison de deux techniques répond à un problème particulier de séparation ou d'études de protéines (11,12,13).

Si la première dimension est obtenue par focalisation iso-électrique, on peut résumer dans la Figure 2. ci-après ce que l'on peut attendre de ces techniques en deux dimensions en fonction du type d'électrophorèse choisi pour la seconde dimension. On notera que l'on écarte de cette Figure 2. l'association Electrofocalisation / Immuno-électrophorèse que nous examinerons en détail dans la deuxième partie de ce chapitre.

► Figure 2.



II. Les Méthodes Immuno-électrophorétiques

II.1. L'Immuno-électrophorèse

L'immuno-électrophorèse constitue le second temps de l'analyse des protéines sériques ou urinaires en biochimie clinique. Elle se pratique en général sur un support d'agarose ou de gélose. L'immuno-électrophorèse standard est un examen essentiellement qualitatif.

II.2. L'Immuno-électrophorèse quantitative

L'immuno-électrophorèse peut être rendue quantitative par des artifices techniques.

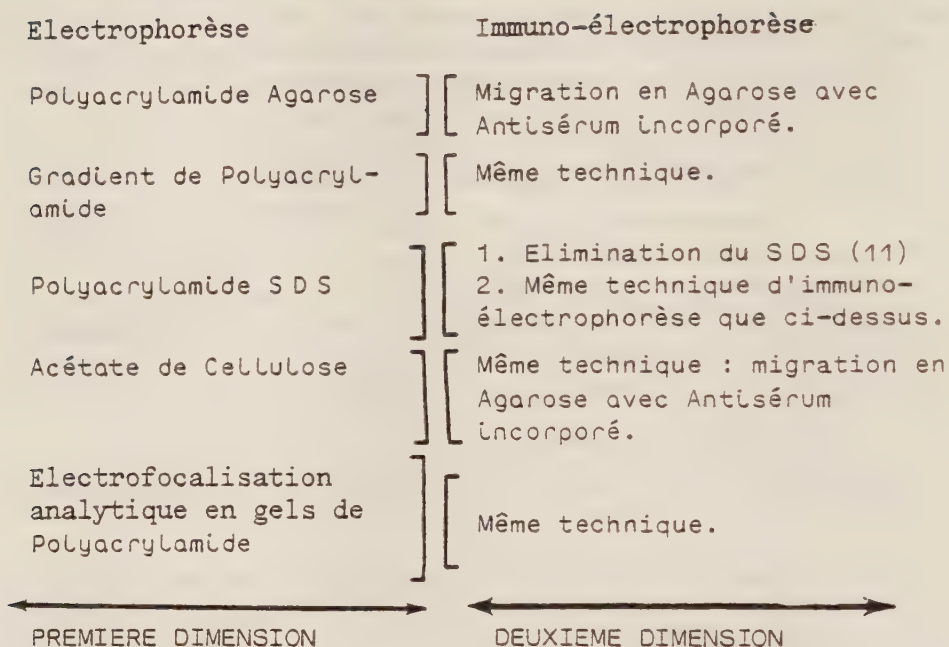
La méthode de Laurell d'électro-immunodiffusion ou "rocket immuno-electrophoresis" permet une quantification des différentes protéines d'un mélange si l'on dispose d'un antisérum monospécifique dirigé contre chaque protéine à étudier.

Cette technique a toutefois été complétée par l'immunodiffusion radiaire de Mancini et la néphélométrie (14).

II.3. L'Immuno-électrophorèse associée : électrophorèse bidimensionnelle, ou immuno-électrophorèse croisée (Tableau VI)

Les possibilités offertes par les deux techniques, c'est-à-dire électrophorèse et précipitation par formation d'un complexe Antigène-Anticorps, sont étendues ; on les présente page suivante, Figure 3.

Figure 3. (11,12,13)



L'immuno-électrophorèse permet d'identifier les constituants d'un mélange de protéines si l'on dispose d'antisérums monospécifiques. En effet, un problème important en électrophorèse analytique est l'identification des composés séparés.

III. Les Méthodes de Détection des Protéines après Electrophorèse

III.1. Les Techniques de Détection non spécifiques des Protéines

• Les deux colorants le plus utilisés dans la détection des protéines sont le Noir AMIDO SCHWARTZ et le Bleu brillant COOMASSIE R 250. Ils présentent une grande sensibilité pour les protéines mais n'ont aucune spécificité. Toutefois les gels ou les membranes colorés peuvent être ensuite analysés par densitométrie avec estimation quantitative des différents pics obtenus.

A noter qu'en électrophorèse sur acétate de cellulose (SEBIA ou GELMAN), le Rouge ponceau S est le colorant usuel, mais il manque de sensibilité.

• Après électrophorèse en gel de Polyacrylamide SDS il est nécessaire d'éliminer le "SDS" par lavage des gels avec un mélange de Méthanol - Eau - Acide acétique (5 : 5 : 1) avant de colorer les gels soit par le Noir AMIDO soit par le Bleu brillant COOMASSIE R 250.

• Des détections par fluorescence ont été réalisées pour des peptides, des polypeptides, ou même des protéines.

III.2. Les Méthodes de Détection spécifique du Type de Protéines

Nous insisterons essentiellement sur les réactions colorées permettant de détecter spécifiquement certaines protéines.

C'est ainsi que la Myoglobine et l'Hémoglobine sont reconnues par du Chlorhydrate de Benzidine en présence d'eau oxygénée (15).

La Céruloplasmine est décelée par sa réaction à la Dianisidine (15).

Enfin, à la limite des réactions spécifiques d'une protéine, des réactions colorées ont été décrites pour l'Haptoglobine (16) et pour des protéines contenant du Tryptophane ou de la Tyrosine (17).

• Qu'elles soient non spécifiques ou spécifiques du type de protéines, les techniques de coloration peuvent être employées lorsque les gels sont granulés, - type SEPHADEX ou BIOGEL - On utilise alors la méthode dite de "l'empreinte" ou "print technique".

Après migration, préalablement à la coloration des gels, une bande papier chromatographique sec est déposée soigneusement à leur surface. Les protéines diffusent du gel vers la bande de papier et, après des temps de contact variables suivant les protéines étudiées, les bandes de papier sont séparées des gels, séchées et colorées. Cette technique de "l'empreinte" a été appliquée à la détection de protéines ou d'enzymes et ce sur différents supports, gels granulés, polyacrylamide, amidon, agarose ou agar. Les résultats les meilleurs sont obtenus avec les gels granulés.

Le papier chromatographique utilisé pour réaliser une "empreinte" après iso-électrofocalisation doit avoir une charge de 120 à 180 g / m² et, avec des gels en couche très mince d'1 mm d'épaisseur, jusqu'à 350 g / m². Il est évident que les colorants des protéines peuvent être utilisés pour colorer leurs empreintes, de même que les substances réagissant en fluorescence avec les protéines.

• Un problème particulier après iso-électrofocalisation avec ou sans "empreinte", est celui de l'interaction possible entre Ampholytes porteurs et colorants.

Pour des concentrations de 0,5 à 1 % de colorants comme Amido BLACK 10 B, bleu de bromophénol, bleu brillant COOMASSIE G 250 ou R 250, violet COOMASSIE R 150, Light GREEN SF, il se forme des complexes peu solubles ou insolubles Ampholytes porteurs - Colorants.

Si les Ampholytes porteurs interfèrent lors de la coloration, on les élimine par lavage avec une solution aqueuse d'acide trichloracétique ou d'acide sulfosalicylique (1 - 3 %). Au niveau de "l'empreinte" différents colorants peuvent être employés et les résultats obtenus comparés. Enfin, une densitométrie semi-quantitative est possible avec "l'empreinte", comme, par ailleurs, la détection de protéines ou de peptides marqués avec un isotope radioactif par contact avec un film sensible (11).

III.3. Les Méthodes de Détection spécifique d'une Protéine donnée

Nous distinguerons successivement entre la détection des enzymes, la détection des substances antigéniques et de substances radio-actives.

* III.3.1. Détection des Enzymes (8,11)

La détection des enzymes, après électrophorèse, peut atteindre une sensibilité et une spécificité élevées. Les techniques utilisées sont inspirées des méthodes histo-enzymatiques.

* L'électrofocalisation analytique (Tableau V) est actuellement la technique électrophorétique la plus résolutive pour l'étude d'enzymes.

Les méthodes de révélation des enzymes peuvent être divisées en plusieurs catégories selon la nature du réactif utilisé pour les rendre visibles :

Réactif chromogénique.

Le substrat est peu coloré. Il est transformé par l'enzyme en un produit bien coloré.

Réactif fluorogénique.

Il varie selon qu'il apparaît ou disparaît en fluorescence en présence de l'enzyme étudié.

Réactif chimique.

Les réactifs de nature chimique sont couplés avec les produits de la réaction enzymatique pour former des composés fortement colorés.

Ces réactifs peuvent également se combiner avec le substrat non transformé.

Réactifs oxydo-réducteurs,

c'est-à-dire susceptibles de donner des réactions de transfert d'électrons.

Ils participent à la réaction enzymatique par des réactions d'oxydoréduction et donnent des produits intermédiaires fortement colorés.

Réactifs enzymatiques

C'est l'utilisation d'enzymes connus pour déceler le ou les produits de la réaction enzymatique étudiée.

Marqueurs isotopiques

Les produits de la réaction enzymatique sont détectés par auto-radiographie.

Il faut noter que ces méthodes ont été employées depuis longtemps en électrophorèse et sont applicables en iso-électrofocalisation. Cependant, pour cette dernière, un ajustement de pH est nécessaire car le pHi de l'enzyme étudié ne correspond pas obligatoirement au pH optimum.

* Dans le cas de substrats de poids moléculaire (PM) faible, ou de coenzymes, les réactions enzymatiques se dérouleront après une simple incubation des réactifs avec le gel ; mais si le substrat est au contraire d'un PM élevé, la détection enzymatique est moins simple du fait de la faible diffusion des réactifs dans le gel. On peut dès lors recourir à plusieurs artifices pour résoudre ce problème.

- L'incorporation du substrat dans le gel avant la séparation électrophorétique, mais la migration peut être perturbée de ce fait.
- La diffusion du substrat dans le gel après séparation, mais il existe une diffusion des enzymes dans le gel, d'où perte de résolution électrophorétique.
- Recouvrement du gel avec un autre gel contenant "in situ" le substrat.
- Recouvrement du gel avec une solution d'agarose contenant le substrat et au pH optimum de l'enzyme.

* Méthode de "l'empreinte" : c'est la technique dont nous développerons ici les conditions.

Les Ampholytes porteurs n'interfèrent pas, ou peu, avec la réaction enzymatique.

Un tampon correspondant au pH optimum de l'enzyme doit imbiber le papier chromatographique utilisé pour l'empreinte. Ce papier est ensuite mis au contact d'une solution aqueuse ou organique du substrat. Il est enfin séché et déposé avec précaution à la surface du gel, le temps de contact gel - papier chromatographique étant fixé empiriquement.

La réaction enzymatique se déroule à l'interface

gel - papier et sur le papier. Les enzymes sont ainsi révélés.

Une densitométrie est possible.

Il est évident que les réactifs nécessaires à la réaction enzymatique doivent être présents en proportions convenables et ils peuvent être ajoutés de façon séquentielle, ou concomitante.

Les avantages de la technique de "l'empreinte" sont nombreux : réalisation aisée ; utilisation de plusieurs substrats sur plusieurs gels pour un seul et même enzyme ; comparaison sur une même empreinte de réactions spécifiques ou non spécifiques ; archivage des résultats.

Dans le cas d'un groupe d'iso-enzymes ou d'un enzyme, il est donc possible d'étudier

- le pH optimum
- le Rapport Enzyme / Substrat (E / S) adéquat
- la nature du substrat
- l'influence d'inhibiteurs, ou d'activateurs

de la réaction enzymatique.

• Cette technique de "l'empreinte" a été appliquée à la détection d'enzymes agissant sur des substrats macromoléculaires (18,19,20). Les activités protéasiques ont été particulièrement étudiées à l'aide de cette technique.

Pour détecter ce dernier type d'activité, le papier utilisé pour "l'empreinte" est imprégné d'une solution tampon contenant le substrat désiré, - caséïne, hémoglobine, par exemple -. Le papier est séché à une température suffisamment élevée pour dénaturer la protéine et, ainsi, permettre une meilleure fixation sur celui-ci. Ce papier est déposé sur le gel. Le temps de contact est variable ; le papier portant l'empreinte est lavé à l'acide trichloroacétique puis l'empreinte est colorée, par exemple au Bleu brillant COOMASSIE : des zones fines et claires, correspondant aux zones d'activité protéolytique, apparaissent sur un fond coloré.

Il est possible de faire varier le Rapport E / S (molaire) pour étudier la protéolyse. De même, les produits de dégradation du substrat peuvent être détectés par une réaction spécifique secondaire.

De nombreux enzymes ont été étudiés grâce à cette technique de "l'empreinte" que nous reverrons lors de la détection immuno-enzymatique des substances antigéniques.

* III.3.2. Détection des Substances Antigéniques

La détection de substances antigéniques, après électrophorèse, peut être réalisée grâce à des méthodes immuno-chimiques utilisant des antisérums monospécifiques. Le complexe Antigène - Anticorps est ensuite mis en évidence par les colorants non spécifiques des protéines, ou par des méthodes enzymatiques, ou encore par une auto-radiographie, selon la nature des antigènes étudiés, ou les anticorps disponibles.

Deux techniques sont utilisables au choix pour former le complexe Antigène - Anticorps.

III.3.2.1/ L'Immunoprécipitation du complexe Antigène-Anticorps dans le Gel (Tableau VII)

par la mise en contact, après l'électrophorèse, des substances antigéniques avec les antisérums monospécifiques correspondants, déposés à la surface du gel.

III.3.2.2/ La technique de "l'empreinte par Immunofixation" ou "Immuno-empreinte" (Tableau VIII)

Une membrane imprégnée de l'antisérum monospécifique puis séchée, est déposée soigneusement à la surface d'un gel. La protéine antigénique diffuse vers la surface du gel et, si le contact gel - membrane est satisfaisant, le complexe Antigène - Anticorps se forme sur la membrane. Celle-ci est ensuite lavée et colorée pour mettre en évidence le complexe Antigène - Anticorps.

⇒ Dans ces deux méthodes, plusieurs paramètres peuvent intervenir dans la formation d'un complexe Antigène - Anticorps.

→ Dans la précipitation à l'intérieur du gel, ou immunoprécipitation,

- { le Rapport des concentrations Antigène / Anticorps,
- { les titres des antisérums monospécifiques,
- { le pourcentage d'acrylamide dans la composition du gel,

interviennent.

Pour réaliser une immunoprécipitation après électrophorèse, les antisérums monospécifiques peuvent être déposés à la surface du gel soit avec une pipette Pasteur et on uniformise la couche d'anticorps avec une baguette de

verre ; soit apportés au moyen d'une membrane d'acétate de cellulose, ou d'un papier chromatographique.

Nous verrons dans le Chapitre III, l'importance des types de membranes ou de papiers chromatographiques disponibles sur le marché pour les résultats obtenus par immuno précipitation.

Il faut noter que le gel, après migration électrophorétique, peut être mis en présence d'une solution fixant les protéines, ou pas.

La durée de contact Antisérum / Antigène est en général d'une douzaine d'heures ; elle peut cependant atteindre 24 heures, rarement 48 heures.

Le gel est ensuite placé dans une solution de chlorure de sodium 9 g / l. pendant 48 heures à 72 heures, la solution étant renouvelée plusieurs fois. Le gel est enfin coloré avec le colorant approprié et décoloré, ce qui laisse apparaître les immuns complexes précipités à l'intérieur du gel.

Cette technique a été appliquée après migration électrophorétique sur amidon, agarose / agar, polyacrylamide-agarose, et par iso-électrofocalisation analytique en gel de polyacrylamide. Si nécessaire les détergents comme le SDS peuvent être éliminés du gel - électrophorèse en polyacrylamide SDS - par lavage en milieu PBS, soit Phosphate 0,01 M : NaCl 0,15 M après fixation des protéines soit par un mélange eau - méthanol - acide acétique 5 : 5 : 1, soit par le glutaraldéhyde.

→ Dans le cas de la technique de l'immuno-empreinte il est nécessaire, pour une concentration fixe et connue d'Antigène, d'imprégner les membranes de concentrations variables d'antisérums (Anticorps). La durée du contact entre gel et membrane a une importance plus grande qu'en immunoprécipitation : elle varie de 1 heure à 12 heures et dépend du type de gel, de sa composition, de son épaisseur, du PM de la protéine étudiée et le contact gel-membrane doit être aussi parfait que possible.

Nous verrons également cette méthode en détail au Chapitre III de ce travail, dans les résultats expérimentaux obtenus par ces techniques.

* III.3. Détection de Substances radio-actives

La détection des substances radio-actives est aisée après électrophorèse. On peut en effet pratiquer une autoradiographie ou, si la substance marquée est antigénique, les deux techniques immuno-chimiques précédentes - immuno-précipitation ou immuno-empreinte - sont applicables.

Nous reviendrons sur ce point Chapitre III de ce travail.

Des techniques plus complexes de détection de substances radioactives ont été décrites (21,22,23).

*

En conclusion,

les méthodes électrophorétiques sont devenues nombreuses. Les méthodes de détection des protéines après électrophorèse sont devenues monospécifiques grâce, en particulier, à l'utilisation d'antisérums monospécifiques. Dès lors de nombreuses protéines peuvent être étudiées et a fortiori les protéines plasmatiques et urinaires.

Annexe

&

Bibliographie

Tableau I. Electrophorèse sur Acétate de Cellulose

1. Supports de migration électrophorétique (utilisés au Laboratoire)

- * cellogel (SEBIA)
- * Sepraphore III GELMAN
- * Super Sepraphore GELMAN

2. Tampon de migration : "Tris - Véronal, pH 8,8" (SEBIA)

3. Conditions de migration :

- * Température ambiante
- * 200 à 250 volts
- * Ampérage variable
- * 35 minutes

4. Révélation

Rouge ponceau S [solution commerciale concentrée
de 5 g de Rouge ponceau S
50 g d'Acide trichloracétique
étendue d'Eau distillée q.s.p. 1 l.]

Coloration : 10 minutes.

5. Décoloration

10 à 15 mn. dans une solution aqueuse d'Acide acétique à 5%.

6. Transparisation

* 2 mn. dans du Méthanol pur

* 1 mn. dans une solution de [Méthanol 150 mL
Acide acétique 40 mL
Di-acétone alcool 10 mL]

sur agitateur horizontal minuté.

* Séchage 15 à 20 mn en étuve thermostatée à 60°C
avec évaporation , sur des plaques de verre propres.

Tableau II. Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide Agarose

I. Préparation des Gels

(Concentration finale T = 5% - Porosité C = 2,6%)

Solutions - mères :

"A" : acrylamide (SERVA)	= 20 ³ / 100
"B" : Bis acrylamide (LABO INTERNATIONAL BV)	= 0,52 %
"C" : Indubiose A.37 (INDUSTRIE BIOLOGIQUE FRANCAISE)	= 20 g/L

Composition des Gels :

1 volume solution "A" : 1 volume solution "B" : 2 volumes solution "C"

La polymérisation est assurée par

persulfate d'ammonium (LABO INTERNATIONAL BV) : 25 mg p.100 ml du mélange "A":"B":"C"
 tetraméthyléthylène diamine (LABO INTERNATIONAL BV) : 0,06 ml p.100 ml du mélange "A":"B":"C"

Les différents composants, placés dans un bain-marie à 70°C, sont mélangés et versés dans un moule 31 x 27 cm donnant un gel de 3 mm d'épaisseur. Les moules sont placés en étuve à 70°C pendant 30 mn.

Les gels sont démoulés et placés en chambre froide + 4°C une nuit, dans le tampon d'imbibition

Tris :	9 gp. litre d'eau désionisée
Glycine :	4,68 g p. litre d'eau désionisée
pH 8.8	

II. Dépôt des Echantillons

- Les échantillons sont dilués au sérum physiologique,
 - * soit une dilution au 1/5 pour les sérums
 - * une dilution au 1/4 pour les urines
- Les tubes sont placés au bain-marie 40°C et on ajoute dans chacun d'eux un volume équivalent d'une solution d'agarose (Indubiose A.37) à 1,6 % dans l'eau désionisée.
- Le dépôt des échantillons se fait à raison de 20 µl dans des puits creusés à l'emporte-pièce dans le gel, après avoir ajouté dans chaque échantillon une goutte de bleu Evans permettant de suivre la migration électrophorétique.

III. Migration électrophorétique

Le Tampon de migration :

Tris :	1,2 g p. litre d'eau désionisée
Glycine :	25 g p. litre d'eau désionisée
pH : 8.4	

Conditions de migration :

+ 4°C
300 - 350 volts
40 - 50 mAmpères / Gel
90 - 120 minutes

... / ..

IV. Coloration des Gels

* Solution-mère du colorant :

* Bleu de Coomassie R 250 (MERCK)	2,5 g
* Acide acétique	100 mL
* Méthanol	500 mL
* Eau distillée	q.s.p. 1.000 mL

* Cette solution-mère est diluée au 1 / 10ème avec une solution :

* Méthanol	= 400 mL
* Acide acétique	= 50 mL
* Glycérol	= 25 mL
* Eau distillée	q.s.p. 1.000 mL

* Durée de la coloration : 8 à 12 heures

V. Décoloration des Gels

* Solution de décoloration :

* Méthanol	200 mL
* Acide acétique	50 mL
* Glycérol	30 mL
* Eau distillée	q.s.p. 1.000 mL.

Tableau III. Electrophorèse en Gradient de Polyacrylamide

I. Gels avec gradient de polyacrylamide

Gels PHARMACIA (Uppsala, Suède)

avec gradient de Polyacrylamide 4% à 30%

4,9 x 82 x 82 mm

II. Tampons d'imbibition et de Migration des Gels

Tris	= 10,75 g / l'eau désionisée
Acide borique	= 5,04 g / l'eau désionisée
Na ₂ EDTA *	= 0,33 g / l'eau désionisée

* EDTA = Acide Ethylène Diamine Tetra-acétique.
pH = 8.3

III. Conditions de Migration électrophorétique

Alimentation EPS 500/400 V (PHARMACIA Uppsala, Suède)

Appareil d'électrophorèse GE / 4 (PHARMACIA)

* Pré-électrophorèse : $\left\{ \begin{array}{l} 125 \text{ Volts} \\ 50 \text{ mA p. Gel} \\ 15 \text{ mn} \end{array} \right.$

puis :

dépôt de 5 μ l de l'échantillon (pur ou dilué)

avec 1 goutte de Glycérine 87% (MERCK)

et :

* Electrophorèse : $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ mn} \\ 70 \text{ Volts puis } 16 \text{ heures} \\ 125 \text{ Volts (voltage constant)} \end{array} \right.$

IV. Coloration des Gels

Bleu de Coomassie R 250 : 0,02 %

solution aqueuse Acide acétique 7 %

V. Décoloration des Gels

Décolorateur GD / 4 (PHARMACIA)

Solution aqueuse Acide acétique à 7 %

pendant 30 à 45 minutes.

Tableau IV. Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide - SDS

I. Matériel et Produits

1. Matériel

Alimentation EPS 500/400 V (PHARMACIA, Uppsala, Suède)

Appareil d'électrophorèse GE / 4 (PHARMACIA) avec couleur de gels GSC8

2. Tampons

Tampon "A"	Tris	= 10,75 g / L	pH = 8.35
	Acide borique	= 5,04 g / L	
	Na ₂ EDTA *	= 0,95 g / L	

* EDTA = Acide Ethylène Diamine Tetra acétique.

Tampon "B"	C'est le tampon "A" avec du SDS	= 2,00 g / L
------------	---------------------------------	--------------

Tampon "C"	C'est le tampon "A" avec du SDS	= 10,00 g / L
------------	---------------------------------	---------------

Tampon "D"	C'est le tampon "A" avec du SDS et dithiothreitol	= 10,00 g / L = 1,00 g / L
------------	---	-------------------------------

II. Préparation des Gels

• Solution "X" • Acrylamide (SERVA) 150 g 150 g
 Bis-acrylamide (LABO INTERNATIONAL) 5 g
 Tampon "A" q.s.p. 1 litre

• Solution "Y" • Persulfate d'ammonium (SERVA) 6 g / L dans le tampon "A"

• Solution "Z" • Propionitrile (FLUKA) (3, diméthylamino propionitrile 6 mL :
 (sulfite de sodium 0,504 g)
 Tampon "A" q.s.p. 1 litre

Les cassettes sont réalisées avec deux plaques de verre carrées 82 mm x 82 mm, deux cales et du ruban adhésif. Un "peigne" est placé à l'une des extrémités de la cassette pour obtenir des "puits" préformés dans le gel.

Les cassettes sont mises en place dans l'appareil PHARMACIA couleur de gels GSC8, les "peignes" étant placés en bas.

Dans un bécher, on mélange les solutions "X", "Y", "Z", dans la proportion 2:1:1 pour obtenir un gel de concentration C = 7,75% ; 140 ml du mélange permettant de préparer 4 cassettes, en utilisant le couleur de gels. Quand la polymérisation est effective, les cassettes sont récupérées, on écarte le gel excédentaire et les "peignes" sont retirés.

III. Traitement des Echantillons

Les échantillons étudiés, ainsi que les échantillons de calibration sont traités, comme suit :

ils sont dissous dans le tampon réducteur "D" et placés 10 mn au bain-marie à 50°C. Pour certaines protéines - IgG par exemple -, l'échantillon est dissous dans le tampon non réducteur "C" avant d'être mis 10 mn à 50°C, ce qui permet d'étudier l'action des agents réducteurs sur la protéine. Au sortir du bain-marie les échantillons sont densifiés avec une solution de Sucrose 5% (1,5 volumes).

Les concentrations finales en protéine varient entre 1 et 2 mg / ml.

.../..

IV. Migration électrophorétique

Le tampon "B" est utilisé dans la cuve GE 4 PHARMACIA

• Pré-électrophorèse :

125 V

50 mA / gel

10 minutes

• Dépôt des échantillons :

25 μ l par "puits"

• Electrophorèse :

[	Prémigration à 70 V	]
	50 mA / gel	
	pendant 15 minutes	
	puis 125 V	
	pendant 1 h. 30	

V. Coloration et Décoloration des Gels

- La coloration utilise Bleu de Coomassie R250
en solution aqueuse d'acide acétique à 7%

- La décoloration au décolorateur GD / 4 PHARMACIA
utilise une solution d'acide acétique à 7% pendant 30 à 45 mn

VI. Mesure des poids moléculaires (PM)

La détermination des PM se fait en portant sur un papier semi-logarithmique la distance de migration R en fonction du logarithme du poids moléculaire des étalons.

Tableau V. Electrofocalisation analytique en couche mince de Gels de Polyacrylamide.

I. Matériel

Multiphor LKB 2117 02 0

Kit d'électrofocalisation en couche mince LKB

Générateur LKB 3371 E 0-2 000 volts

II. Méthode et Produits

- * Solutions - mères : "A"

Acrylamide (SERVA)	29,1 %
Bisacrylamide (SERVA)	0,9 %
- "B" } Solution Saccharose 20,5 %
- * Solution Anodique : $\text{PO}_4 \text{H}_3, 1 \text{ M}$
- * Solution Cathodique : $\text{Na OH}, 1 \text{ M}$
- * Composition du Gel en couche mince de polyacrylamide :

Solution "A"	=	20 ml	
Solution "B"	=	36 ml	
Ampholine ^R pH 4-6	=	2,5 ml	}
pH 3,5-5	=	0,5 ml	
			= 3 ml

La polymérisation est assurée par une solution de persulfate d'ammonium à 1 % (1 ml) mais, auparavant, les différents composants sont mélangés et le mélange dégazé sous vide pendant 10 mn, puis le persulfate est ajouté en mélangeant. Le gel liquide est versé immédiatement dans le moule (kit d'électrofocalisation) de 125 x 260 x 2 mm et, en moins de 30 mn, la polymérisation est effective.

Le gel a une épaisseur de 2 mm et il se caractérise par une concentration finale en acrylamide T = 5 %
une porosité C = 3 %

Les échantillons à étudier sont déposés du côté cathodique (v. Fig. ci-contre) sur des rectangles de papier Nr 2043 a Mg 11 (SCHLEICHER-SCHÜLL) découpés aux dimensions voulues.

Le contact avec les électrodes est réalisé par l'intermédiaire de baguettes de papier-filtre S 16125 LKB imbibées respectivement des solutions anodique et cathodique.

L'électrophorèse dure 4 h., le voltage étant progressivement augmenté de façon à maintenir dès le début 1 200 V / 25 W, en veillant à ce que la plaque de verre du Multiphor soit réfrigérée à + 4°C en permanence par en-dessous.

La migration terminée,

le gel peut être utilisé en 1ère dimension d'une immuno-électrophorèse croisée (v. Tableau VI, page suivante)
ou pour une immuno-empreinte (Cf. Tableau VIII.)

.../..

ou, enfin, être utilisé immédiatement :

III. Coloration & Décoloration

La coloration se fait pendant 30 mn dans le bain colorant à 80°C

Bleu de Coomassie R 250 (MERCK)	= 0,75 g
Méthanol ordinaire	= 225 mL
Eau désionisée ou distillée	= 465 mL
Acide sulfosalicylique	= 22,5 g
Acide trichloracétique	= 75,0 g

La décoloration a lieu dans le mélange Eau - Ethanol - acide acétique selon les proportions correspondantes 8 : 3 : 1.

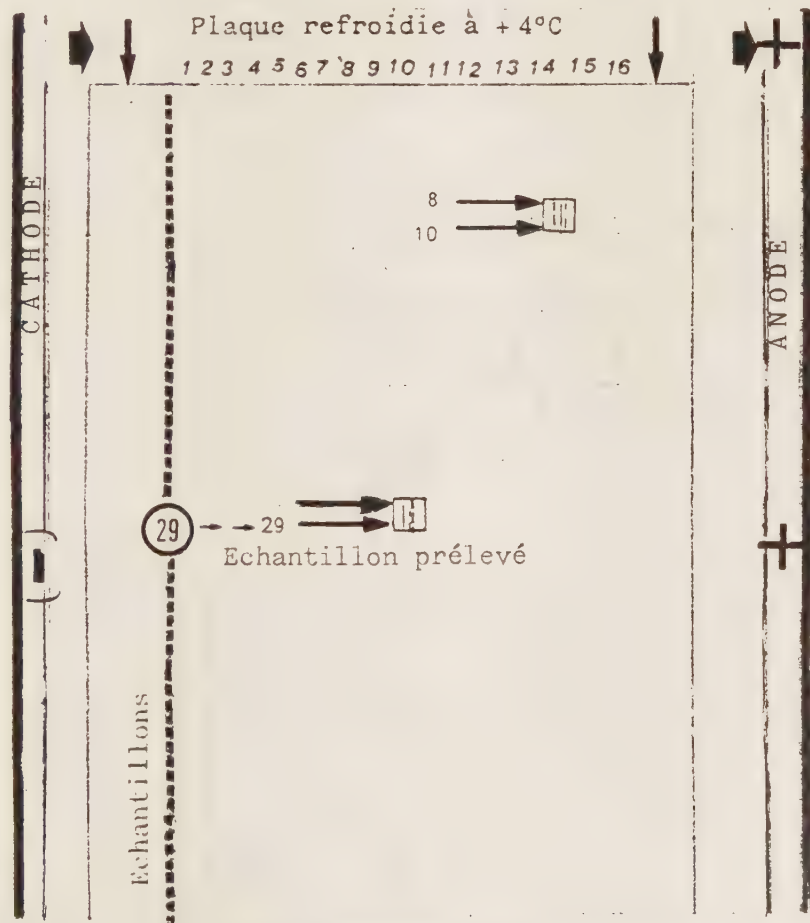


Tableau VI. Immuno-électrophorèse croisée

Matériel :

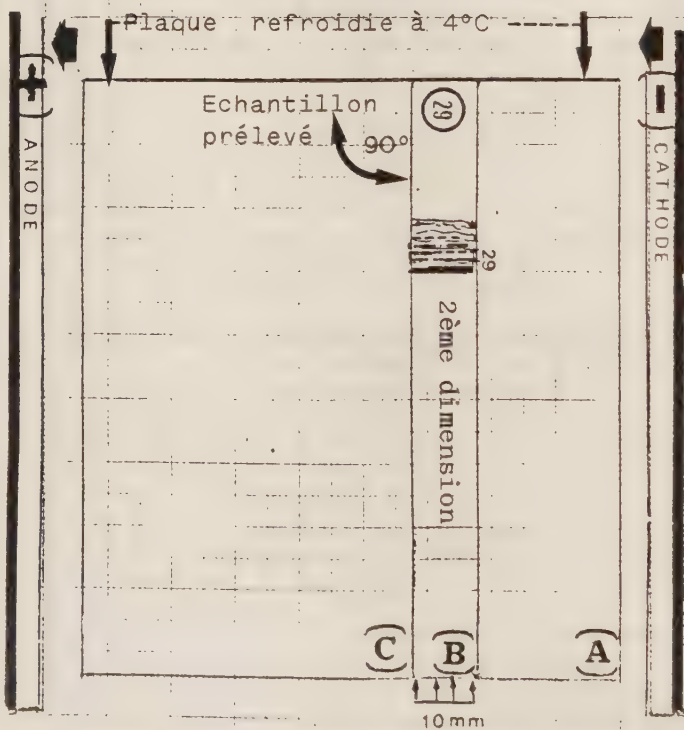
Multiphor L K B 2117

Générateur L K B 3371 E

Plaques de verre 94 x 84 x 1 mm

La manipulation est précédée d'une Electrofocalisation en couche mince de gel de polyacrylamide (Cf Figure et Tableau V précédents), qui fournit une migration électrophorétique de la protéine étudiée (Echantillon 29 par exemple) ou électrophorèse en 1ère dimension.

Ce gel est découpé sur 10 mm de large et placé en "B" entre les gels-tampons "A" et "C" de la plaque ci-dessous, soit à 90° par rapport à l'électrophorèse précédente, en 2ème dimension.



Réalisation de l'immuno-électrophorèse croisée

On coule sur chaque plaque, selon la figure ci-contre :

* dans la zone "A"

5 ml { d'une solution d'Agarose (MILLS) à 1 %
dans du tampon Durrum dilué à 50 %
dans l'eau distillée

* dans la zone "C"

10 à 12 ml { d'une solution d'Agarose (MILLS) à 1 %
dans du tampon Durrum dilué à 50 %
dans l'eau distillée
et contenant par addition, suivant la quantité
d'antigène,

x ml d'Antisérum global, ou spécifique.

* dans la zone "B"

le gel d'électrofocalisation de 10 mm de large
prélevé sur un gel en couche mince (Cf Tableau V et La
Figure ci-contre) et contenant la protéine à étudier :
c'est le gel de 1ère dimension.

La migration en 2ème dimension ("B") se fait

[	entre 5 et 10°C	
	avec une intensité de 5 à 10 mA	pour 3 plaques
	sous 60 V pendant 12 à 14 h.	
	ou 250 V pendant 4 h.	pour 3 plaques
]		

La révélation nécessite

* de placer les plaques pendant 48 h.

dans NaCl, 0,15 M + 0,1 % de Na₂N₃

Les plaques sont ensuite rinçées à l'eau distillée,
séchées et colorées avec les colorants habituels.

Tableau VII. Techniques d'Immunoprécipitation
(Références bibliographiques)

Références	Particularités de la technique d'Immunoprécipitation et / ou d'Electrophorèse
ALPER, C.A., JOHNSON, A.M. Vox Sang., 17, 445, (1969).	→ Electrophorèse en Agarose (Groupes GC, Céruloplasmine, (C3.))
CARREL, S., THEILKAES, L., SKVARIL, S., BARANDUN, S. J. Chromatogr., 45, 483, 1969	→ Focalisation iso-électrique avec addition d'Antisérums sur la cou- che de polyacrylamide (Protéines du sérum)
COTTON, R.G.H., MILSTEIN, C. J. Chromatogr., 86, 219, 1973	→ Focalisation iso-électrique (Etude de protéines myélomateuses (chez la Souris et le Rat.))
FELGENHAUER, K. Method. Fortschr. Med. Lab. 1, 51, 1974	→ Immunoprécipitation après électro- phorèse en gel de polyacrylamide Agarose.
STUMPH, W.E., ELGIN, S.C.R., HOOD, L. J. Immunol., 113, 1752, 1974	→ Détection d'Antigènes par électrophorèse en gradient de polyacrylamide - SDS suivie d'une immunoprécipitation.
CHANG, C.H., INGLIS, N.R. Clin. Chim. Acta, 65, 91, 1975	→ Immunoprécipitation après électro- phorèse sur Acétate de cellulose.
CAWLEY, L.P., MINARD, B.J., TOURTELOTTE, W.W., MA, B.I., CHELLE, C. Clin. Chem., 22, 1262, 1976	→ Electrophorèse en Agarose (Immunoglobulines mono- ou poly- (clonales dans le LCR)).
JOHNSON, A.M. J. Labor. Clin. Med., 87, 152, 1976	→ Electrophorèse en Agarose (Phénotypes de l' $\alpha 1$ Antitrypsine)
NEUHOFF, V., MESECKE, S. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1623, 1977	→ Electrophorèse en gel de polyacryl- amide (Protéines sériques humaines et Effets des détergents sur l'im- munoprécipitation).
BJERRUM, O.J. Biochim. Biophys. Acta, 472, 135, 1977	→ Electrophorèse en Polyacrylamide- SDS : révélation immuno-enzymo-
OLDEN, K., YAMADA, K.M. Anal. Biochem., 78, 483, 1977	→ logique par la technique "sand- wich".

Références	Particularités de la Technique d'Immunoprécipitation et / ou d'Electrophorèse
BURRIDGE, K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 4457, 1976	→ [Electrophorèse en polyacrylamide - SDS et utilisation d'Anticorps marqués à l'Iode 125*.
WEBB, K.S., MICKEY, D.D., STONE, K.R., PAULSON, D.F. J. Immunol. Meth., 14, 343, 1977	→ [Etude de protéines virales en polyacrylamide SDS : corrélation entre PM et antigénicité.
MA, B.I., TOURTELOTTE, W.W., TURPIN, R.A., CAWLEY, L.W. Amer. J. Clin. Path., 67, 210, 1977	→ [Une méthode de détection d'IgG oligoclonales dans le LCR.
SUN, T., LIEN, Y., KUNINS, M. Clin. Chem., 23, 1154, 1977	→ [Comparaison entre Immuno-électrophorèse et Immunofixation dans le cadre des Gammapathies monoclonales.
KOHN, J., RICHES, P.G. J. Immunol. Meth., 20, 325, 1978	→ [Immunoprécipitation sur Acétate de Cellulose.
KAHN, S.N., THOMPSON, E.J. Clin. Chim. Acta, 89, 253, 1978	→ [Quantification de Protéines après Immunoprécipitation en gel de polyacrylamide.
JOHNSON, A.M. Ann. Clin. Labor. Sci., 8, 195, 1978	→ [Immunoprécipitation Phénotypes GC, α 1 Antitrypsine, C3
WEITKAMP, L.R., ROSENFELD, S., JOHNSTON, E. Cytogenet. Cell. Genet., 22, 651, 1978	→ [Etude de la fraction 5 du Complément (polymorphisme, en particulier).
PINK, J.R.L., ZIEGLER, A., Authors, In : p.169 "Immunological Methods" I. LEFKOVITS & B. PERNIS, Ed. Academic Press, N.Y., 1979	→ [Revue générale sur l'Immunoprécipitation.
SHELL, M.A., WILSON, D.B. J. Biol. Chem., 254, 1979	→ [Purification d'une Galactokinase mRNA à partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .

Références	Particularités de la Technique d'Immunoprécipitation et / ou d'Electrophorèse
LUDWIG,B., CAPALDI,R.A. Biochem. Biophys. Res. Comm., 87, 1159, 1979	→ Immunoprécipitation d'une ATP - synthétase de mitochondries de coeur de boeuf.
PIZZOLATO,M.A., GONI,F.R., SALVAREZZA,R.C. J. Immunol. Meth., 26, 365, 1979	→ Immunoprécipitation sur Acétate de cellulose. Application à l'étude des immuno- globulines monoclonales humaines.
TEISNER,B., FOLKERSEN,J., HINDERSSON,P., JENSENIUS,J.C., WESTERGAARD,J.G. Scand. J. Immunol., 9, 409, 1979	→ Immunoprécipitation de la $\beta 1$ - glycoprotéine spécifique de la grossesse. Quantification sur gel de cette protéine.
LAURENZI,M.A., LINK,H. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 42, 368, 1979	→ Caractérisation et étude de la mobilité électrophorétique de protéines dans le sérum et le LCR par immunofixation.
IRJALA,K., RAJAMAKI,A. Scand. J. Clin. Labor. Invest., 39, 277, 1979	→ Immunofixation pour l'identifica- tion de protéines myélomateuses humaines.

Tableau VIII. Technique de l'Immuno-empreinte (Références bibliographiques)

Protéines étudiées : / Technique électrophorétique utilisée /

1. protéines sériques Electrophorèse en gel d'agarose , pH 8,6
R.F.RITCHIE, R.SMITH, Clin. Chem., 22, 497, 1976
2. α 1 Antitrypsine Electrophorèse en gel d'agarose , pH acide
R.F.RITCHIE, R.SMITH, Clin. Chem., 22, 1735, 1976
3. Immunoglobulines monoclonales Electrophorèse en gel d'agarose , pH 8,6
R.F.RITCHIE, R.SMITH, Clin. Chem., 22, 1982, 1976
4. α 1 Antitrypsine Focalisation iso-électrique en couche mince de polyacrylamide pH 4-6
Ph.ARNAUD, G.B.WILSON, J.KOISTINEN, H.H.FUDENBERG, J. Immunol. Methods, 16, 221, 1977
- Groupes GC Focalisation iso-électrique en couche mince de polyacrylamide pH 4-6
5. J.CONSTANS, M.VIAU, Science, 198, 1070-1071, 1977
6. J.CONSTANS, M.VIAU, G.PISON, A.LANGANEY, Japan. J. Human Genet., 23, 111-117, 1978
7. α 1 Antitrypsine Electrophorèse en gel d'agarose , pH 8,6
Complexes α 1AT - Elastase
J.S.BAUMSTARK, J. Immunol. Methods, 23, 79, 1978
8. Immunoglobulines monoclonales Electrophorèse sur acétate de cellulose
H.H.KARINKANTA, E.J.NIEMINEN, Clin. Chem., 24, 1639, 1978
9. Transferrine Focalisation iso-électrique en couche mince de polyacrylamide
Traitements à La Neuraminidase
P.KUINL, W.SPIELMANN, Human Genet., 43, 91, 1978
10. Groupes GC Focalisation iso-électrique , pH 4-6
H.CLEVE, W.PATUTSCHNICK, S.NEVO, G.G.WENDT, Human Genet., 44, 117-122, 1978
11. Groupes GC - Action de
Vitamine D Focalisation iso-électrique , pH 4-6,5
Neuraminidase
H.Van BAELEN, R.BOUILLON, P.De MOOR, J. Biol. Chem., 253, 6344-45, 1978
12. TBG - Autoradiographie Focalisation iso-électrique sur acétate de cellulose , pH 4-6
D.BURNETT, A.R.BRADWELL, D.B.RAMSDEN, XXVIIIth Coll. Prot. Biolog. Fluids, Bruxelles, 1979
(à paraître, Pergamon Press, 1980)
13. Revue générale : Applications de l'Electrophorèse et de la Focalisation iso-électriques
en Biochimie clinique.

Bibliographie

- (1. H.R. MAURER
Disc Electrophoresis and related techniques
In : "Polyacrylamide Gel Electrophoresis", H.MAURER editor,
W. De Gruyter, publisher, Berlin, New York, 1971, p.60-63

- (2. A.L. SHAPIRO, E. VINUELA, V. MAIZEL jr.
Biochem.Biophys. Research Communications 28, 815, 1967

- (3. a. K. WEBER, M. OSBORN
J. Biol.Chem., 244, 4 406, 1969

- b. M. LASKY
In : "Electrophoresis 78", N.Catsimpooulas, editor,
Elsevier, North Holland, publisher 1978, p.195 - 210

- (4. H.R. MAURER
Voir Référence (1.) : p.67

- (5. A. COLLE, C. TONNELLE, M. LECLERCQ, Y. MANUEL
Clin.Chim.Acta, 65, 223, 1975

- (6. J.P. REVILLARD
Lyon Médical, 233, 737, 1975

- (7. W.H. BOESKEN, E. NOLLER
In : XXIInd Colloquium on Protides of Biological Fluids, Bruges 1974
H. Peeters editor, Pergamon Press, London, Publisher, 1975

- (8. B.J. RADOLA, D. GRAESSLIN, Editors,
In : "Electrofocusing and Isotachophoresis", p.253, 1977

- (9. In : J. of Chromatography
Bibliography Sections : "ELECTROPHORESIS"

- (10. C.W. WRIGLEY
In : XVIIth Colloquium on Protides of Biological Fluids, Bruges 1969
H. Peeters, editor, Pergamon Press, Oxford, Publisher, 1970

- (11. N. CATSIMPOOLAS, Editor
In : "Isoelectric Focusing", Academic Press, New York, Publisher, 1976

- (12. In : Référence (8.) : p. 369 - 419

- (13. P.G. RIGHETTI, J.W. DRYSDALE
J. of Chromatography, 98, 271, 321, 1974
- (14. N.H. AXELSEN, J. KRØLL, B. WEEKE, Editors
In : "A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis
Methods and Applications" Universitetsforlaget, Oslo, 1973
- (15. H.R. MAURER
Voir Référence (1.) : p. 76
- (16. K. FELGENHAUER
Clin.Chim.Acta, 27, 305, 1970
- (17. K.A. FERGUSON
Metabolism, 13, 21, 1964
- (18. T. WADSTROM, C.J. SMYTH
Science Tools, 20, 17, 1973
- (19. T. WADSTROM, C.J. SMYTH
In : "Isoelectric Focusing of Proteins and related Substances"
J.P.Arbutnoth, J.A. Beeley, editors, Butterworths, London, Publ.
1975, p. 155-157
- (20. C.J. SMYTH, T. WADSTROM
Analyt. Biochem., 65, 137, 1975
- (21. In : Référence (1.) p. 93-102
- (22. W.M. BONNER, R.A. LASKEY
European J. Biochem., 46, 83-88, 1974
- (23. R.A. LASKEY, A.D. MILLS
European J. Biochem., 56, 335-341, 1975

=====

Chapitre II

Protéines sériques et urinaires étudiées

Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes protéines sériques et urinaires étudiées en immunoprécipitation et par immuno-empreinte.

Nous insisterons essentiellement sur certains aspects de leur structure, de leur métabolisme, ainsi que sur leur déterminisme génétique.

S o m m a i r e

	page
I. Les Immunoglobulines	39
I.1 Ig A (Figure 4)	41
I.2 Ig M	43
I.3 Ig G	44
I.4 Ig D	--
I.5 Ig E	45
I.6 Protéines de Bence-Jones sériques et / ou urinaires	-- --
I.7 Fragments de chaînes Légères (L) d'immunoglobulines	47
I.8 Maladies des chaînes Lourdes (H) d'immunoglobulines	48
II. Les Groupes Gc ("Group-components")	51
III. La Transferrine (Trf) (Figure 5)	53
IV. L'Haptoglobine (Hp) (Figures 6, 7, 8 et 9)	57
V. L' A1 Antitrypsine (A1AT) (Figure 10)	67
VI. Les protéïnuries	73
Annexe & Bibliographie	
Tableau I. Propriétés des immunoglobulines humaines	79
Tableau II. Modèles de structure Ig M, Ig A ₁ et Ig G ₁	80
Tableau III. Structure des Ig humaines et PBJ	81
Tableau IV. Classes, sous-classes et allotypes des régions constantes des chaînes (L) et (H) des immunoglobulines.	82
Tableau V. Corrélations entre affections pathologiques et déficits génétiques ou quantitatifs en α 1AT	83
Bibliographie du Chapitre II. (97 références)	85

I. LES IMMUNOGLOBULINES

* Les immunoglobulines sont des glycoprotéines qui présentent un rôle physiologique essentiel caractérisé par une pluripotentialité. Les immunoglobulines constituent un ensemble fortement hétérogène qui est le reflet de la variabilité fonctionnelle de ces protéines, plus précisément de la capacité de reconnaissance spécifique des motifs chimiques des substances antigéniques définissant ainsi la fonction Anticorps des immunoglobulines. Cependant cette dernière n'est pas exclusive : en effet des immunoglobulines sans fonction anticorps ont été décrites.

* Les immunoglobulines ont été réparties, suivant leur parenté structurale et leurs propriétés antigéniques, en cinq Classes pouvant comporter des Sous-classes. Les propriétés physicochimiques et les principales propriétés immunologiques des immunoglobulines des cinq Classes sont réunies dans le Tableau I. (Annexe).

* La structure chimique des immunoglobulines des différentes Classes a été bien étudiée, nous présentons sur les Tableaux II. et III. (Annexe), les structures des immunoglobulines avec les différences possibles entre chaque Sous classe.

* Il faut noter enfin qu'un dysfonctionnement de la production des immunoglobulines est possible, constituant une gammopathie. C'est sur le matériel produit par les plasmocytes anormaux qu'ont été réalisées la plupart des études de structure portant sur les immunoglobulines.

I.1. Les Immunoglobulines A (Ig A)

* Les immunoglobulines A constituent la seconde Classe en importance des immunoglobulines du sérum après les immunoglobulines G (Ig G). Dans les sécrétions, les Ig A sont la Classe d'immunoglobulines la plus répandue.

Chez l'Homme, les Ig A circulantes sériques sont présentes sous trois formes moléculaires,

- une forme monomère (85 % du total) ;
- une forme polymère (Ig A)₂J, dont en particulier n=2, ⁿ qui est la forme dimère, "J" étant une pièce glycoprotéique de jonction, commune avec la Classe des Ig M ;
- enfin, un faible pourcentage (1 %) d'Ig A sécrétoire, ou "s" Ig A ayant la formule (Ig A)₂J.SC où SC est le composant sécrétoire.

L'existence de formes moléculaires différentes dans les Ig A sériques peut entraîner des risques d'erreur lors du dosage des Ig A sériques en immunodiffusion radiaire selon la technique de Mancini et, surtout, des discordances entre les résultats obtenus avec cette dernière et la néphélométrie : la distribution en pourcentages entre les différentes formes d'Ig A sériques peut être profondément modifiée en particulier dans le cas des myélomes à Ig A.

* Les Ig A présentent deux Sous-classes : Ig A₁ et Ig A₂ que nous écrirons Ig A1 et Ig A2.

Les Ig A1, dans le sérum normal sont la sous-classe prépondérante - environ 90 % du total -, alors que dans les sécrétions la proportion d'Ig A2 peut approcher celle d'Ig A1. L'incidence de la sous-classe Ig A2 dans les myélomes est plus grande que ne le laisse prévoir son taux sérique.

Sur le plan structural les Ig A des deux sous-classes diffèrent par leur région charnière mais aussi par leur composition en sucres et leur susceptibilité à la protéolyse. Les symboles chimiques de leurs chaînes lourdes H sont respectivement $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Les chaînes H $\alpha 2$ possèdent deux allotypes : $\alpha 2$ Am(+) et $\alpha 2$ Am(-), qui diffèrent par le type des liaisons en jeu entre les chaînes lourdes et les chaînes légères (Annexe et Bibliographie : Tableaux II, III, IV. (1).

* Les IgA humaines résistent au clivage protéolytique par la papaïne, la pepsine et la trypsine. Cependant une enzyme protéolytique, mise en évidence dans la salive humaine et les sécrétions coliques et isolée de *Streptococcus sanguis*, clive l'IgA humaine en fragments Fab et Fc avec de bons rendements (2). De même *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* respectivement, sécrètent une enzyme protéolytique hautement spécifique capable de cliver l'IgA1, mais non l'IgA2, au niveau de la région charnière. Il a été démontré que les IgA2 possèdent une délétion portant sur 12 à 13 amino-acides dans la région charnière par rapport à la même région charnière des IgA1, ce qui expliquerait l'action des IgA1 protéases (3) (Cf. Fig.4, ci-après)

* Enfin, les IgA sériques forment des complexes avec certaines protéines du sérum, en particulier l'albumine, l' α_1 antitrypsine, les β lipoprotéines, les haptoglobines. La signification physiopathologique de tels complexes n'est pas encore élucidée (4).

I.2. Les Immunoglobulines M (IgM)

* Les Immunoglobulines M présentent un intérêt particulier car elles constituent la première Classe d'Anticorps synthétisée lors de la réponse immunitaire primaire, ou lors d'une stimulation antigénique chez le nouveau-né.

Chez l'Homme, les IgM sont normalement présentes sous la forme pentamérique de Constante de sédimentation 19 S. Cependant des polymères 26 S et 32 S sont souvent présents. Quelquefois, la sous-unité monomérique 8 S est décelable dans le sérum.

Comme dans le cas des IgA sériques, les sous-unités d'IgM s'associent et la forme pentamérique comporte une pièce de jonction appelée "pièce J". Cette "pièce", de PM = 15.000 δ , comporte 129 acides aminés dans sa structure primaire et les "pièces J" provenant respectivement d'IgA et d'IgM humaines sont similaires dans leur structure. Dans les IgA et IgM humaines la chaîne J est attachée à la Cystéine C-terminal de la chaîne lourde α ou μ . Toutefois, dans le cas d'une molécule pentamérique d'IgM, il n'existe par molécule de polymère qu'une seule pièce J : les modes de liaison chaîne J - monomère d'IgM sont encore mal connus.

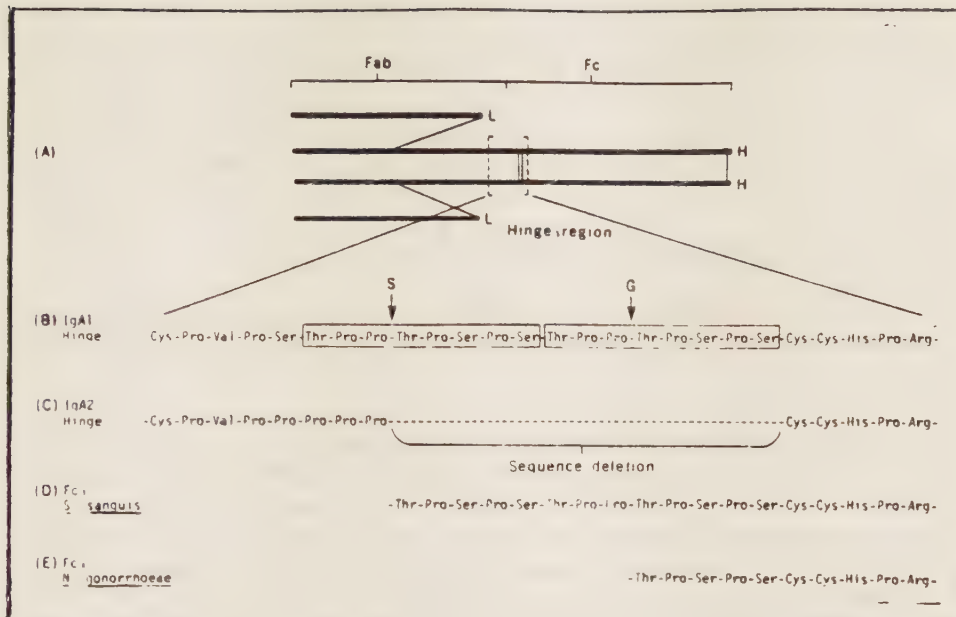


Figure 4.

Schémas moléculaires de la région charnière d'une IgA1 et d'une IgA2 humaines.

(reproduit de la Fig. 30 page 97 in F.W.Putnam, ("The Plasma Proteins, 1977 Vol.3, d'après Plaut (et al.1975)

- A. = schéma d'une IgA monomère (PM 170 000 δ)
 B. & C. = séquences des régions charnières d'IgA1 & IgA2
 D. & E. = respectivement les restes N terminaux des attaques de *S.Sanguis* (S) et *Naesseria gonorrhoeae* (G) sur la pièce double de la région charnière d'IgA1

Remarque : la délétion de la région charnière d'IgA2, qui englobe la pièce double, explique pourquoi cette classe d'IgA échappe à la protéolyse enzymatique de *Nesseria gonorrhoeae* ou *S. Sanguis* (Cf texte page précédente).

* Le clivage des IgM par les agents chimiques ou enzymatiques est possible. La nature des fragments obtenus varie considérablement d'un agent de clivage à l'autre (5). Enfin, des marqueurs allotypiques ont été mis en évidence sérologiquement sur les chaînes $H\mu$ des IgM humaines, mais leurs positions n'ont pas encore été précisées (6).

I.3. Les Immunoglobulines G (Ig G)

* La Classe des immunoglobulines G constitue la Classe d'immunoglobulines prépondérante dans le sérum humain normal.

Elle comporte quatre Sous-classes Ig G 1, Ig G 2, Ig G 3 et Ig G 4. Chacune des sous-classes est déterminée par sa chaîne lourde, c'est-à-dire $H\gamma 1$, $H\gamma 2$, $H\gamma 3$, $H\gamma 4$. La fréquence des sous-classes dans les gammopathies monoclonales est respectivement de 77%, 14%, 6%, 3%. Ceci correspond d'ailleurs aux pourcentages respectifs des sous-classes d'Ig G dans le sérum humain normal.

* Les séquences des chaînes lourdes des sous-classes des Ig G ne sont connues que très partiellement et on sait que les plus grandes différences de structure se rencontrent dans la région charnière et dans la position du pont disulfure entre chaînes lourdes et légères (Cf Tableau III Annexe). Des différences de structure conditionnent l'action des agents de clivage (7).

* Enfin, des marqueurs allotypiques sont connus au niveau des chaînes lourdes des quatre sous-classes d'Ig G (8) (Cf Tableaux I., IV., Annexe).

I.4. Les Immunoglobulines D (Ig D)

* Il existe peu d'informations sur la structure des Ig D. Les principales causes de cette lacune sont

- la concentration basse des Ig D dans un sérum normal,
- la fréquence faible des protéines myélomateuses,
- le clivage spontané fréquent des Ig D par les enzymes protéolytiques du plasma ;
- enfin, le rôle physiologique exact des Ig D, qui est encore discuté.

* La structure générale d'une molécule d'IgD est celle d'une immunoglobuline avec une paire de chaînes lourdes $H\delta$ et une paire de chaînes légères κ ou λ .

* Il est surtout intéressant de souligner l'extrême sensibilité des IgD aux agents protéolytiques. En effet, il est indispensable de prévenir cette action lors du prélèvement, en recueillant le sang du patient sur Acide ϵ amino caproïque. Les fragments $Fab\delta$ et $Fc\delta$ sont formés en 2 mn par incubation avec de la trypsine, le fragment $Fab\delta$ peut ensuite être clivé à nouveau par la trypsine (9).

I.5. Les Immunoglobulines E (IgE)

* Le rôle biologique des IgE dans les phénomènes allergiques a suscité de nombreux travaux.

La structure des protéines myélomateuses IgE a été explorée malgré leur extrême rareté. La protéine myélomateuse d'IgE est une molécule monomérique à 4 chaînes, comme les immunoglobulines G.

Sur le plan physicochimique, l'action ménagée de la pepsine aboutit à la formation de fragments Fc' et de fragments $F(ab')_2$. La papaïne produit un fragment Fab typique et un fragment Fc . D'autres fragments ont été isolés, en particulier un fragment Fc'' correspondant à un domaine de la portion constante de la chaîne lourde $C_{H\epsilon}$ (10).

I.6. Les Protéines de Bence-Jones

* La découverte de la protéine de Bence-Jones fut basée sur certaines de ses propriétés physicochimiques : solubilité et comportement thermique. Cette protéine en effet, devenait insoluble dans l'eau entre 50 et 60°C mais de nouveau soluble entre 90 et 100°C. Le refroidissement entraînait sa précipitation. Ce comportement thermique était différent de celui de l'albumine et d'autres protéines sériques présentes dans les urines.

* Les protéines de Bence-Jones sériques et / ou urinaires sont mises en évidence par les méthodes électrophorétiques

et immunochimiques. Cependant, la détection d'une protéine de Bence-Jones dépend de la sensibilité et des limites de diagnostic de la méthode d'analyse employée : type d'électrophorèse, concentration urinaire en protéines, titre, avidité et spécificité des antisérums utilisés, etc. La présence d'une protéine de Bence-Jones sérique est déterminée par les méthodes immunochimiques. On notera qu'une protéine de Bence-Jones sérique est possible sans qu'il y ait de protéinurie de Bence-Jones : en effet, les protéines de Bence-Jones peuvent constituer des polymères de haut poids moléculaire non filtrés par le glomérule rénal normal et, à l'inverse, un catabolisme tubulaire rénal peut dégrader une protéine de Bence-Jones sérique. Des protéines de PM plus bas que celui de la protéine de Bence-Jones mais possédant des déterminants antigéniques communs avec celle-ci ont été décelés dans les urines de malades présentant un myélome multiple des os (11). Des études immunochimiques ont montré que les petits constituants urinaires qui possèdent des caractères antigéniques communs avec la protéine de Bence-Jones sérique correspondante sont surtout des fragments portant l'extrémité N terminale plutôt que des fragments portant l'extrémité C terminale.

* Des analyses séquentielles en acides aminés des protéines de Bence-Jones ont montré qu'elles comportent des régions variables V et des régions constantes C. Les régions variables renferment l'extrémité N terminal, alors que les régions constantes possèdent l'extrémité C terminal.

A l'intérieur des régions variables il existe des zones hypervariables dans lesquelles la séquence en acides aminés d'une chaîne de spécificité donnée varie considérablement par rapport à celle d'une autre chaîne pourtant de même spécificité.

Les régions variables, V_L , sont de deux types V_x et V_λ , mais des sous-groupes ont été mis en évidence dans les régions variables des chaînes légères V_x et V_λ (12) : (Cf Tableaux III & IV. Annexe).

I.7. Les Fragments de Chaînes Légères (L) d'Immunoglobulines

* Nous avons vu les différents types possibles de clivage enzymatique, ou chimique, des immunoglobulines. Ces clivages intéressent les chaînes Légères (L) et / ou les chaînes lourdes (H) des immunoglobulines.

* Les chaînes Légères L des immunoglobulines peuvent être clivées spécifiquement en deux portions C_L et V_L par un facteur protéolytique présent dans les urines mais également dans des extraits tissulaires rénaux (11). De plus certaines endopeptidases produisent les mêmes effets. Avec ces agents de clivage, à 37°C la portion V_L ne subit pas de protéolyse importante à l'opposé de la portion C_L mais, à l'inverse, à 55°C la portion V_L est fortement dégradée en petits peptides et la portion C_L est conservée ou peu touchée.

* La relative facilité de préparation des portions V_L et C_L des chaînes Légères des immunoglobulines a permis de mettre en évidence le fait que les propriétés de thermosolubilité des chaînes Légères se rattachent à la portion V_L .

De même, certaines spécificités antigéniques idiotypiques de la chaîne Légère intacte sont exprimées par la portion isolée V_L et non par la portion C_L .

Bien que le marqueur allotypique Inv (Cf Tableau IV, Annexe) soit situé sur la portion C_L des chaînes x , C_x , l'antigénicité correspondante de la chaîne Légère est exprimée seulement lorsque la chaîne Légère est intacte : elle disparaît lors du clivage de cette dernière en ses deux régions C_x et V_x .

* Des résidus oligosaccharidiques ont été décelés dans la région V_L de 6 à 15% des chaînes Légères d'immunoglobulines. Bien que ces résidus soient en principe situés sur la portion constante de la chaîne lourde de l'Ig C_H , ils peuvent donc se rencontrer dans les régions V_H ou V_L . La présence d'acide sialique dans les chaînes Légères et dans les protéines de Bence-Jones peut être suspectée par l'apparition d'une micro-hétérogénéité à l'électrophorèse sur certains supports. On notera que le site d'attachement du résidu oligosaccharidique est habituellement de structure tripeptidique $[Asn - X - Ser / Thr]$ X étant un acide aminé variable.

I.8. Les Maladies des Chaînes Lourdes (88)

* Les protéines des maladies des chaînes lourdes ont été définies comme des molécules comportant une chaîne lourde entière ou partielle sans chaîne(s) Légère(s) associée(s).

Le premier cas de maladie des chaînes lourdes décrit chez l'Homme a été une maladie des chaînes $H\gamma$ (13,14). La protéine anormale était présente dans le sérum et dans l'urine ; elle comportait le Fragment Fc. En 1968, Seligmann a décrit un autre type de maladie des chaînes lourdes intéressant la chaîne $H\alpha$ (15). La troisième catégorie de maladie des chaînes lourdes, par atteinte des chaînes $H\mu$, a été mise en évidence par Forte et Coll. (16). Dans les deux premières affections les chaînes Légères sont le plus souvent absentes, alors qu'elles sont fréquemment synthétisées dans la dernière.

* Les protéines de maladies des chaînes lourdes ont des Constantes de sédimentation assez variables mais en général entre 3,5 et 4_S ; leurs poids moléculaires se situent entre 45 000 et 55 000 δ .

* Ces protéines sont souvent très hétérogènes et riches en sucres.

* Franklin et Frangione ont classé les protéines des maladies des chaînes $H\gamma$ en quatre types dont les séquences en acides aminés sont actuellement connues.

→ Dans le Type I, il existe une délétion concernant une partie de la région variable et le domaine C_H1 . La délétion prend fin au niveau de l'acide aminé 216, juste avant la région charnière, cette dernière se situant entre les domaines C_H1 et C_H2 .

→ Dans le Type II, il existe une délétion au niveau de la région charnière.

→ Dans le Type III, il y a délétion partielle de la région variable et délétion totale du domaine C_H1 et de la région charnière.

→ Quant au Type IV, il correspond au Fragment Fc des protéines γ_1 et commence au niveau de la région charnière.

→ Dans les trois Types I, II et III, il peut exister des délétions, d'importance variable, intéressant la région Fd, et une ré-initiation de la synthèse au niveau de la région charnière (88).

* Ces constatations ont un intérêt fondamental sur le plan génétique : elles suggèrent en effet la séparation des gènes codant respectivement pour les portions V et C des chaînes H et amènent au concept du phénomène du "crossing over" ou **non - appariement** de segments de gènes qui codent pour des domaines entiers.

Beaucoup moins d'informations sont disponibles sur les protéines de maladies des chaînes H_{α} et H_{μ} . Cependant il a été mis en évidence des délétions internes intéressant le Fragment Fd.

* En résumé,
pour les protéines de maladies des chaînes lourdes de tous Types et de toutes Classes dont les séquences sont actuellement connues, il existe une délétion interne plus ou moins importante et une initiation - ou une ré-initiation - de la synthèse de la chaîne H au voisinage de son point de commutation $V_H - C_H$ ou de la région charnière (17, 17 bis).

II. LES GROUPES Gc

* Les Groupes Gc ont été découverts par Hirschfeld en 1959 (18) sous le terme de "Group-components".

Leur migration électrophorétique les situe dans la zone α_2 -globulines. Leur taux sérique est en moyenne de 0,4 g p.l. En immuno-électrophorèse il a été mis en évidence trois phénotypes principaux : le phénotype 1-1, qui donne une ligne de précipitation entre les α_1 et les α_2 globulines ; le phénotype 2-2, dont la ligne de précipitation se situe entre celles de l' α_2 macroglobuline et de la transferrine ; enfin le phénotype 1-2 qui donne avec un antisérum total - ou anti-Gc - une réaction d'identité partielle avec les deux phénotypes précédents. L'électrophorèse en gel d'amidon, puis en gel de polyacrylamide, a permis de mettre en évidence le polymorphisme des Groupes Gc.

* Sur le plan biochimique, il n'existe pas de différence de poids moléculaire entre les protéines Gc 1-1 et Gc 2-2, leur P.M. moyen étant de 50 800 δ .

La composition en acides aminés des bandes rapides et des bandes lentes respectives des phénotypes Gc 1-1 et Gc 2-2 est très similaire : il existe une proportion élevée d'Acide aspartique et d'Acide glutamique et une proportion plus faible d'Histidine et de Cystéine.

La composition en sucres des Groupes Gc est faible (4,2%). Il est intéressant de noter que des expériences menées avec la neuraminidase sont contradictoires. Pour certains auteurs l'action de la neuraminidase ne modifie pas la micro-hétérogénéité des Groupes Gc mais, pour d'autres, l'action de cette enzyme aboutit - tout au moins pour certains phénotypes - à une migration plus cathodique des bandes électrophorétiques.

La structure primaire des protéines Gc 1-1 et Gc 2-2 est encore mal connue. Bowman (19) pense que les protéines Gc consisteraient en trois Sous-unités très si-

milaires et indissociables ; une de ces Sous-unités serait commune aux phénotypes Gc 1-1 et Gc 2-2 .

* Sur le plan génétique, Hirschfeld (18) a démontré une transmission mendélienne des Groupes Gc . Ceux-ci sont déterminés par une paire d'allèles autosomiques et co-dominants, désignés par Gc 1 et Gc 2.

Un allèle rare et silencieux a été déterminé par Henningsen (20) et, à côté des trois phénotypes usuels, il existe des phénotypes rares, ou variants rares, qui ont été mis en évidence (21). La technique de l'immunofixation associée à une séparation par focalisation iso-électrique en couche mince de polyacrylamide, a permis de révéler des bandes supplémentaires pour chacun des phénotypes Gc 1-1 et Gc 2-2 . Ces tracés ont été expliqués par l'existence de sous-types : le phénotype Gc 1-1 serait ainsi représenté par les phénotypes Gc 1F - 1F , (F étant mis pour "fast" c'est-à-dire mobile), Gc 1F - 1S (S étant mis pour "slow" c'est-à-dire lent), et Gc 1S - 1S.

L'association des sous-types Gc 1S et Gc 1F avec le gène Gc² donne deux nouveaux phénotypes Gc 2-1F et Gc 2-1S (22). Des études de familles ainsi que des études de populations ont été faites avec ce système Gc (22).

* Sur le plan biologique, la fonction des Groupes Gc a été pendant longtemps inconnue et c'est en 1975 que Daiger et Coll. ont démontré l'identité de ces protéines avec l' α_2 globuline porteuse de la Vitamine D (23). L'emploi de l'auto radiographie a également prouvé le polymorphisme de cette α_2 globuline. Enfin l'immunofixation a récemment permis de décrire des modifications des mobilités électrophorétiques Gc en gels de focalisation iso-électrique en présence de 250 H cholécalférol et de 1 α 250 H cholécalférol (24).

* Sur le plan pathologique, aucune affection n'est liée spécifiquement à la production des protéines Gc . Les Groupes Gc ont surtout été étudiés comme marqueurs génétiques. Les études actuelles sont surtout consacrées aux liens les unissant à la Vitamine D et à ses métabolites actifs dans le sérum. La technique d'immunofixation seule ou associée à l'autoradiographie est ici une méthode de choix.

III. LA TRANSFERRINE (Trf)

* La transferrine présente une mobilité électrophorétique β et sa concentration plasmatique est de 2,50 g/l en moyenne. C'est une protéine transporteuse de Fer, l'existence d'une protéine liant spécifiquement le fer plasmatique ayant été découverte en 1945 par Holmberg et Laurell (25).

* Sur le plan biochimique, l'utilisation des techniques autoradiographiques avec le Fer-59 a permis d'étudier la migration électrophorétique de la transferrine humaine sur différents supports et avec différents systèmes tampons. L'électrophorèse en zone libre de la forme la plus commune, la transferrine C, a mis en évidence une ferri-transferrine et une apo-transferrine. En gel d'amidon, pour cette même transferrine humaine C, trois bandes ont été identifiées correspondant respectivement à l'apo-transferrine, la transferrine porteuse d'un atome de Fer, et la transferrine porteuse de deux atomes de Fer. Le poids moléculaire, PM, de la transferrine est de 76 000 δ , mais des auteurs ont trouvé un PM supérieur, 90 000 δ .

La molécule de transferrine, nous l'avons vu, peut se lier avec un ou deux ions ferriques. Cette liaison met en jeu également un ion bicarbonate par ion ferrique et est dépendante du pH.

La transferrine se lie également avec de nombreux métaux de transition et de la série des lanthanides. De plus elle se lie avec les ions ferreux avec une vitesse de réaction qui, pour certains auteurs, est supérieure à celle de sa liaison avec les ions ferriques.

La séquence des acides aminés et la conformation des sites de liaison du Fer sur la molécule de transferrine sont inconnues.

* Deux fractions antigéniques différentes de transferrine peuvent être décelées dans un sérum humain normal. Cependant cette différence antigénique peut disparaître

lors d'une saturation en Fer. Il semblerait qu'une modification réversible de détermination antigénique, décelable par les techniques immunochimiques, ait lieu lors de la liaison Fer-transferrine.

* La composition en acides aminés des transferrines humaines a été bien étudiée.

Aucune différence notable des acides aminés n'a été dépistée entre les Transferrine C et Transferrine D_{GF} ni entre les Transferrines B₂, C et D₁. Il est à noter que la Cystéine, d'un pourcentage élevé dans la molécule, représente un obstacle à la détermination de la séquence des chaînes polypeptidiques obtenues par clivage chimique - par le BrCN - ou enzymatique - trypsine, etc. - de la transferrine. Cette séquence n'est d'ailleurs pas encore complètement connue.

Mais si la séquence des acides aminés n'est pas déterminée, par contre on connaît la séquence complète des chaînes oligo-saccharidiques de la transferrine humaine. La composition en sucres de la transferrine est faible : 5,7%. La présence d'acide sialique sur les chaînes oligo-saccharidiques en position terminale a été reconnue très tôt. Après action de la neuraminidase, la transferrine C donne cinq bandes en gel de polyacrylamide ou en gel d'amidon. L'élimination de l'acide sialique ne modifie pas la capacité de liaison de la molécule de transferrine avec l'ion ferrique. Qui plus est, la comparaison des variants génétiques a montré, dans le cas de la transferrine humaine, que les différences de mobilité électrophorétique étaient liées non pas à une différence de composition en acide sialique, mais à des modifications de la structure protéique elle-même.

* Sur le plan génétique, il existe un polymorphisme de la transferrine. Les variants sont identifiés par leur mobilité en gel de polyacrylamide ou en gel d'amidon. L'autoradiographie a permis d'attribuer les différentes bandes obtenues à la transferrine. L'ordre des mobilités électrophorétiques en gel de polyacrylamide est donné Figure 5, ci-après (28).

Ces variants possèdent des différences de structure portant sur les acides aminés de la chaîne protéique : des différences d'un seul acide aminé ont été révélées par digestion tryptique ou par action du bromure de cyanogène.

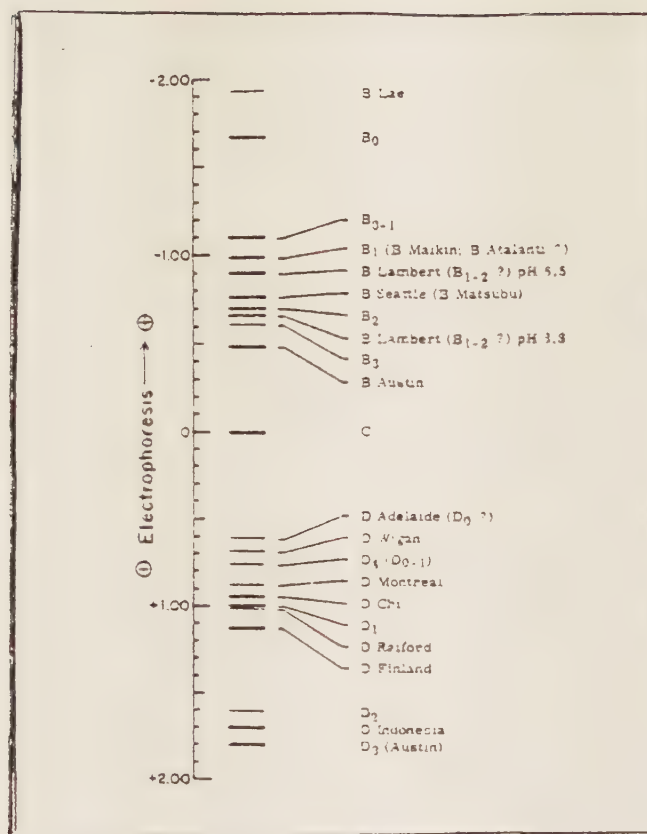


Figure 5. : Transferrine sérique humaine (Tf)

Schéma montrant Les mobilités respectives
des variants génétiques de la transferrine
humaine.

N.B. Reproduction de la Fig.7 In F.W.Putnam, "The Proteins",
1976, elle-même d'après Sutton et Jamieson, 1972.
(Cf. Bibliographie, 26 et 28).

Le problème est alors d'expliquer comment des variants génétiques présentant des modifications aussi infimes de composition en acides aminés, peuvent induire de telles différences de mobilité électrophorétique, sans introduire soit un concept de structure organisée en sous-unités, soit l'hypothèse de variations dans la forme moléculaire de la transferrine (26, 27, 28, 29).

* Sur le plan biologique, le rôle principal de la transferrine est le transport du Fer plasmatique et sa distribution vers les organes de stockage et la moelle osseuse.

En biologie clinique, la capacité totale de fixation du Fer correspond à la quantité de Fer en microgrammes, μ g, susceptible d'être liée par 100 ml de sérum. Cette capacité peut être remplacée par le chiffre du dosage immunochimique de la transferrine du sérum.

* Le rôle de liaison de la transferrine n'est cependant pas unique. En effet, la transferrine gouverne le transport du Fer au système réticulo-endothélial. Elle peut d'une manière réversible, libérer l'ion ferrique et, à la différence de l'haptoglobine, n'est pas dégradée in situ. Des études ont été réalisées pour mettre en évidence les interactions Transferrine - ou apo-transferrine - Réticulocyte chez le Lapin : des sites de liaison à la surface du réticulocyte présentent une affinité pour la transferrine beaucoup plus élevée que pour l'apo-transferrine.

* La transferrine possède deux autres fonctions biologiques : d'une part elle participe au contrôle de la concentration en Fer plasmatique et, d'autre part elle prévient la perte de Fer par l'urine.

* En pathologie, on retiendra surtout l'hémochromatose primaire dans le diagnostic biochimique de laquelle interviennent le dosage de la transferrine sérique, du Fer sérique et la mesure de la capacité de fixation du Fer.

Si l'a-transferrinémie est tout à fait exceptionnelle, l'hypotransferrinémie observée en dehors de toute atteinte pathologique ne l'est pas et il a été discuté d'un déficit congénital en transferrine.

IV. L'HAPTOGLOBINE (Hp)

* L'Haptoglobine (Hp) est une glycoprotéine sérique, de mobilité α_2 en électrophorèse sur acétate de cellulose. Elle fut mise en évidence pour la première fois en 1939 par Polonovski et Jayle, sous forme d'un complexe avec l'hémoglobine doué d'activité peroxydasique. C'est en 1955 que Smithies révéla les trois principaux phénotypes de l'Hp par électrophorèse en gel d'amidon, en les désignant par les symboles Hp 1-1, Hp 1-2, Hp 2-2. Le gel de polyacrylamide a actuellement supplanté le gel d'amidon pour la détermination des phénotypes de l'haptoglobine. Le dosage quantitatif de l'haptoglobine sérique est effectué par méthodes immunochimiques. Les concentrations obtenues varient selon le phénotype de l'haptoglobine présent.

* Sur le plan biochimique (30) le phénotype Hp 1-1 apparaît comme une protéine homogène, à la différence de l'Hp 2-2 qui comprend des polymères, alors que l'Hp 1-2, en ultracentrifugation analytique, donne au moins trois constituants. Dès lors, il est difficile de parler de la détermination du poids moléculaire PM.

Chaque haptoglobine comprend deux chaînes polypeptidiques α et β . Pour chacun des deux phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-2, on trouve deux chaînes α différentes dénommées α^1 et α^2 respectivement. La formule moléculaire de l'Hp 1-1 devient $[\alpha^1\beta]_2$, tandis que la formule d'Hp 2-2 est $[\alpha^2\beta]_n$ où $n = 2, 3, 4, \dots$. La formule de l'Hp 2-1 renferme des chaînes α^1 et α^2 et s'écrit $[\alpha^1\beta]_m \cdot [\alpha^2\beta]_n$. (Cf. Figure 6., page suivante (30)).

Pour le phénotype homozygote Hp 1-1 un PM voisin de 100 000 δ a été trouvé par ultracentrifugation, mais la chaîne α^1 présente deux sous-types F = "Fast" et S = "Slow"; si le PM d'une chaîne α^1 S déterminé sur des données obtenues par séquence est de 9 304 δ , le PM d'une chaîne β évalué par ultracentrifugation est de 42 582 δ ce qui, en dernier ressort, indique un PM $\simeq 10^5$ pour l'Hp 1-1. (Cf. Figure 6, ci-après) (30,31). On sait par ailleurs que le PM d'une chaîne α^2 est de 17 300 δ (30,31).

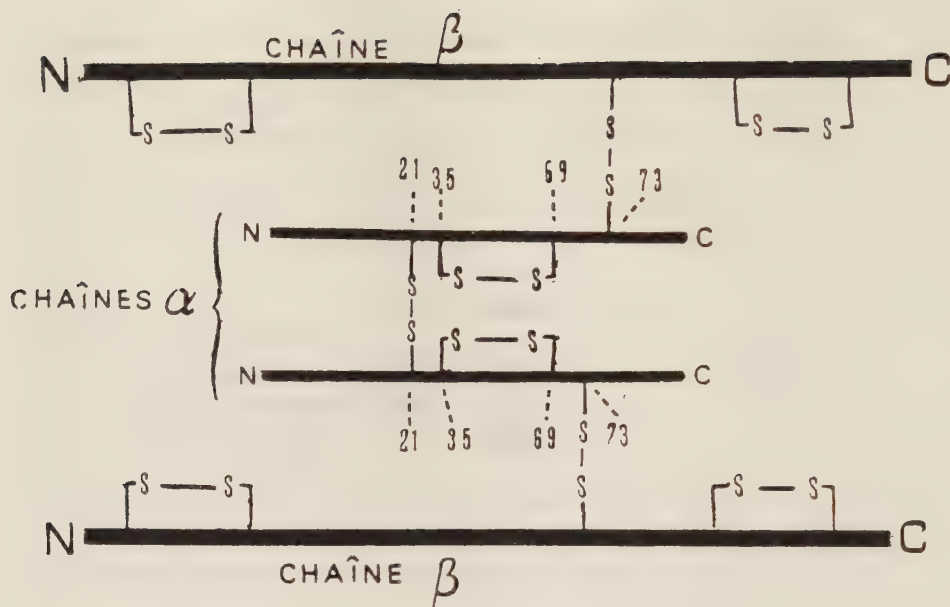


Figure 7. D'après F.W.Putnam (30, p.20)

Haptoglobine

Modèle moléculaire selon MALCHY.

Structure tetracaténaire :

2 chaînes "lourdes" β

2 chaînes "légères" α

unies par des ponts disulfure

N = extrémité N terminal

C = extrémité C terminal

* Nous avons vu plus haut que la liaison entre l'haptoglobine et l'hémoglobine était à l'origine de la découverte de la première. Les liaisons que mettent en jeu les complexes Hp-Hb A sont non covalentes. L'haptoglobine se combine stoechiométriquement avec l'Hb A en donnant un complexe stable d'une mole d'Hp pour une mole d'Hb A : la réaction est irréversible.

Le complexe peut aussi se former entre l'haptoglobine et la globine mais pas entre haptoglobine et hème ni entre l'haptoglobine et la myoglobine.

La formation du complexe Hp-OxyHb A est irréversible et, dans le cas du complexe Hp-DésoxyHb A, la courbe de fixation de l'O₂ sur la molécule d'Hb A est modifiée.

La chaîne α de l'hémoglobine est nécessaire à la formation du complexe et de très nombreuses études ont été effectuées sur la cinétique de cette formation : des intermédiaires réactionnels ont été proposés. Nous n'insisterons pas sur ces points ni sur la nature des liaisons entre Hp et Hb A qui est encore fort discutée. La formation du complexe Hp-Hb conduit à des changements significatifs des propriétés de l'hémoglobine. (Hp-Hb) a une affinité élevée pour l'oxygène (Hp-oxy-Hb A) mais il perd l'effet Bohr. De nombreuses études physicochimiques ont été réalisées sur l'hémoglobine liée à l'haptoglobine (32,33,34,35,36).

* La structure moléculaire de l'haptoglobine est assez bien connue. La composition en acides aminés des trois principaux phénotypes est assez voisine, du fait probablement, de la présence d'une chaîne commune β , et de ce que la chaîne α^2 est une duplication partielle de la chaîne α^1 .

Ces trois phénotypes d'Hp ne diffèrent pas significativement par leur composition en sucres.

La structure primaire de l'Haptoglobine ressemble à celle des immunoglobulines : il existe une structure tétra chaînes avec "deux chaînes légères" (α) et "deux chaînes lourdes" (β). Le modèle proposé est celui de Malchy et Coll. cité par F.W. Putnam (30 : page 20) et nous le reproduisons Figure 7., ci-contre.

On notera que si, dans ce modèle moléculaire Fig. 7, la position des résidus cystéïnyles formant des ponts di-sulfure interchaînes et intrachaînes est connue, celle des résidus cystéïnyles engagés dans ce même type de liaison disulfure sur les chaînes α ne l'est pas encore.

L'existence de cette structure comportant deux chaînes polypeptidiques α et β unies par des ponts di-sulfure entraîne la présence de polypeptides distincts en électrophorèse en milieu urée-mercaptoéthanol (amidon) (Cf. Figure 8, ci-après(30)).

* Le polymorphisme moléculaire de l'haptoglobine humaine résulte, usuellement, de mutations génétiques dans la structure primaire de la chaîne α . Les chaînes $\alpha 1F$ et $\alpha 1S$ renferment 84 résidus d'acides aminés : les deux chaînes diffèrent seulement par un acide aminé en position 54.

La chaîne Hp $\alpha 2$ comporte 143 résidus et consiste en portions des chaînes Hp $\alpha 1F$ et $\alpha 1S$. La chaîne Hp $\alpha 2$ est un exemple d'une duplication partielle d'un gène.

La structure primaire de la chaîne β a été mise en évidence : il existe des homologies avec les octodecapeptides obtenus à partir de l'extrémité N-terminale de la chymotrypsine et de la trypsine bovines. Une homologie similaire est trouvée pour les nonapeptides à partir de l'extrémité C-terminale de ces mêmes enzymes. Il n'existe pas d'homologie similaire entre les chaînes β et les chaînes lourdes μ , γ , ou α , des immunoglobulines humaines.

* Les sucres présents dans la molécule d'haptoglobine sont essentiellement localisés sur la chaîne β . Il n'y a pas de différences de composition en sucres entre les principaux phénotypes et cette composition avoisine 20%. Les séquences des unités oligosaccharidiques ne sont pas encore connues. La neuraminidase élimine 70% de l'acide sialique de la molécule d'Hp et la molécule obtenue conserve sa possibilité d'association avec l'hémoglobine A (Hb A).

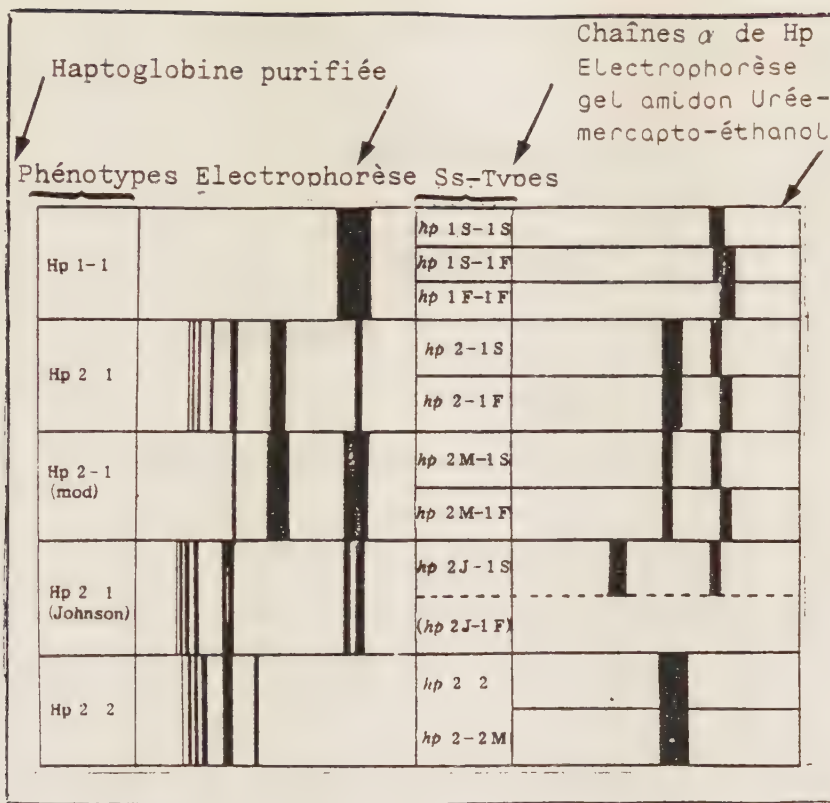


Figure 8. Haptoglobine (Hp)

Représentation schématique des tracés électrophorétiques en gels d'amidon des phénotypes habituellement rencontrés de l'Haptoglobine humaine et de leurs sous-unités respectives.

Les sous-unités de Hp 2-1 (Johnson) ont les chaînes α Hp 2-1 et 1S.

N.B. Reproduction de la Fig.3 In F.W.Putnam The Proteins, 1977, p.21, d'après Giblett et Brooks, 1963.
(Cf. Bibliographie, 30)

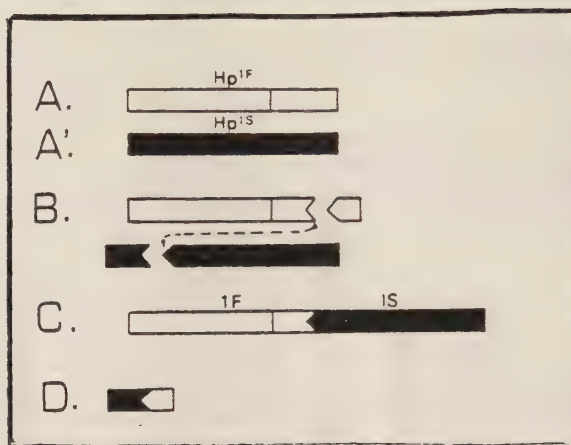


Figure 9. Haptoglobine (Hp)

Schéma du mécanisme de la formation du gène Hp 2 par arrangement chromosomique des gènes Hp 1 S et Hp 1 F après rupture des deux gènes initiaux en des points extrêmes très éloignés l'un de l'autre.

- A. Hp 1 F : Le trait vertical indique le site de la substitution Lys $\rightarrow$ acide glutamique
- A'. Hp 1 S : se différencie du précédent par l'absence du site
- B. : rupture chromatidienne et réarrangement des deux restes en
- C. : gène Hp 2 (duplication partielle de Hp 1)
- D. : second gène par délétion ?

N.B. Reproduction de la Fig.5 In F.W. Putnam, 1977, The Proteins, d'après Giblett, 1969.
(Cf. Bibliographie (30).

* Sur le plan génétique, les mutations connues sont de trois types :

- A. une mutation ponctuelle résultant en une substitution en position 54 sur la chaîne $\alpha 1$ Acide glutamique $\rightarrow$ Lys, différenciant ainsi respectivement $\alpha 1^S$ et $\alpha 1^F$;
- B. un réarrangement chromosomique conduisant à une duplication génique partielle : formation du gène Hp^2 à partir des gènes Hp^1^S et Hp^1^F . (Fig.9, ci-contre) ;
- C. des altérations dans le contrôle de la vitesse de la synthèse des chaînes α ou β , avec diminution de la synthèse de l'haptoglobine.

On notera, pour ces différentes mutations,

* que les phénotypes $\alpha 1^F$ et $\alpha 1^S$ ne sont détectés qu'après réduction et alkylation des haptoglobines, suivies par une électrophorèse en milieu dissociant (urée, 8 M). La chaîne β , dans la protéine native, masque les changements de charge ;

* que la formation du gène Hp^2 a été réalisée par arrangement chromosomique à partir des gènes Hp^1^S et Hp^1^F . L' Hp a d'ailleurs été le premier exemple de protéine dans lequel un réarrangement chromosomique a été soupçonné, pour être ensuite affirmé par l'analyse séquentielle en acides aminés des chaînes α (Cf. Figure 9, ci-contre (30).

* A côté des variants génétiques présentés Figure 8 (page 62), il existe des variants génétiques rares (30). Ils comportent, soit des mutations affectant la chaîne α , soit des mutations sur la chaîne β . Ces mutations peuvent concerner un seul, ou plusieurs acides aminés. Outre des variants génétiques n'apportant qu'une modification qualitative de l'haptoglobine, il existe des variants génétiques rares amenant des modifications quantitatives de l'haptoglobinémie (30, 37 à 43).

Des conditions physiologiques et pathologiques peuvent entraîner une anhaptoglobinémie, ou une hypo-haptoglobinémie. L'anhaptoglobinémie est caractéristique du nouveau-né jusqu'à l'âge de 3 mois ; cependant, elle peut être liée à des conditions pathologiques - affections hépatiques sé-

vères, hémolyse intravasculaire massive -. Qui plus est, une synthèse déficiente de l'haptoglobine d'origine héréditaire avec hypo - ou anhaptoglobinémie idiopathique, est possible. On parle alors d'Hp 0. L'allèle Hp0 est considéré comme un allèle silencieux ; sa fréquence est très faible - 0,005 -. Cet allèle ne produirait pas une chaîne capable de se combiner à la chaîne β pour former l'haptoglobine (30).

* En pathologie, nous le rappelons, les taux sériques bas d'Hp sont observés dans les maladies hépatiques sévères, - le foie étant le lieu de synthèse principal de l'Hp - et dans les anémies hémolytiques où l'haptoglobinémie ne s'effondre, en général, que dans les poussées hémolytiques aiguës. Des taux bas d'haptoglobinémie sont également présents dans des hémoglobinopathies - drépanocytoses avec anémie par exemple -.

Il n'existe aucune spécificité en pathologie pour une élévation de l'haptoglobinémie : on la retrouve dans des affections au long cours - tuberculose, diverses atteintes ostéo-articulaires dégénératives, sclérose en plaques -, ou lors d'affections aiguës - traumatisme par exemple -.

Nous avons vu que le foie est le lieu principal de la biosynthèse de l'haptoglobine, mais il est également le lieu principal de son catabolisme, qu'il s'agisse de l'Hp ou du complexe Hp - Hb A. Ce catabolisme s'effectue au niveau des cellules de Küpffer du SRE hépatique.

Le métabolisme de l'haptoglobine est fortement dépendant des conditions physiologiques individuelles. Sur ce plan physiologique elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme du Fer, évitant, du fait de sa complexion avec l'hémoglobine A, le passage de cette dernière dans les urines en quantités significatives.

V. L' α 1 ANTITRYPSINE (α 1AT)

L' α 1 antitrypsine a été isolée en 1959 par Bundy et Mehl (57).

* Elle constitue, avec l' α 2 macroglobuline - α 2M -, l'un des deux inhibiteurs des protéases les plus quantitativement importants dans le sérum. Ces deux inhibiteurs sont caractérisés par un spectre d'inhibition très large, qui inclue en particulier : la trypsine, la chymotrypsine, la thrombine, la plasmine, l'urokinase, la collagénase et l'élastase. La principale localisation de l' α 1AT se fait dans les liquides extracellulaires : 40 % dans le sérum à la concentration moyenne de 0,2 g/l. et 60 % dans le compartiment extravasculaire. A l'opposé, l' α 2M, le second inhibiteur des protéases en importance, est présent à 80 % dans le compartiment intravasculaire.

* La biosynthèse de l' α 1AT est réalisée presque exclusivement par le foie. L'accumulation, à l'intérieur des hépatocytes, d'un matériau antigéniquement identique à l' α 1AT du sérum correspondant, est mise en évidence chez tous les sujets porteurs d'un allèle Z par les techniques d'immunofluorescence, d'immuno-enzymologie et en microscopie électronique.

* Sur le plan biochimique, le problème majeur a été l'obtention d'un matériau pur. Différentes techniques de purification ont été proposées (58,59,60). Actuellement, les méthodes les plus prometteuses associent la chromatographie d'affinité - Con-A - Sepharose ; Cibacron.blue.Sepharose -, la chromatographie d'échange d'ions - DEAE Cellulose - et la focalisation iso-électrique préparative.

→ L' α 1AT est une glycoprotéine de PM compris entre 50 000 et 55 000 δ . Le taux des sucres est de 12 % environ.

→ La molécule d' $\alpha 1$ AT est constituée par une seule chaîne polypeptidique. L'existence d'un seul pont disulfure dans la molécule semble acceptée par la majorité des auteurs, il n'en va pas de même pour la nature des acides aminés N et C-terminaux (61,62,63) et nous n'insisterons pas sur ce dernier point encore très discuté.

→ La nature des liaisons engagées dans la formation des complexes $\alpha 1$ AT-protéases reste mal connue : la stoechiométrie de la réaction $\alpha 1$ AT - protéase est en général d'une mole pour une mole. Aucune information n'est disponible sur la structure des zones de contact entre $\alpha 1$ AT et protéases. La structure primaire de l' $\alpha 1$ AT n'est d'ailleurs que partiellement déterminée (64). Pour beaucoup d'auteurs, les liaisons mises en jeu lors de la formation des complexes sont des liaisons covalentes car ceux-ci ne sont pas dissociés en présence d'agents réducteurs et dénaturants.

→ La structure des chaînes oligosaccharidiques greffées sur la chaîne polypeptidique de l' $\alpha 1$ AT n'est connue que depuis peu (65) : 4 unités oligosaccharidiques seraient branchées sur un résidu d'asparagine. La séquence des chaînes oligosaccharidiques isolées à partir d'un sérum contenant un phénotype Pi M a montré la richesse en mannose et en N-acétyl-glucosamine de ces unités.

★ Le problème majeur à résoudre lors de l'étude biochimique de l' $\alpha 1$ AT est l'existence de nombreux phénotypes et la détermination de la structure primaire de ceux-ci. Dès lors, sur le plan structural, on a recherché les différences entre les divers phénotypes tant au plan de la séquence des acides aminés qu'à celui de l'analyse séquentielle des sucres engagés dans les chaînes oligosaccharidiques.

→ Laurell et coll. (59) ont isolé l' $\alpha 1$ AT de sérums de sujets homozygotes M, S et Z et ont trouvé

→ une substitution d'un acide aminé sur l'un des 8 fragments obtenus par traitement de la molécule purifiée par le bromure de cyanogène : ainsi, l'acide glutamique dans la protéine du phénotype M est substitué par la lysine dans la protéine du phénotype Z ;

→ mais il ne semble pas exister de différence notable en acide sialique entre les protéines des phénotypes M et Z.

→ Dans une autre étude publiée par Hercz et coll. (66), une préparation d' $\alpha 1$ AT pure a été obtenue à partir de tissu hépatique d'un sujet homozygote ZZ. La protéine isolée réagit avec un antisérum anti- $\alpha 1$ AT, mais ne possède pas la capacité d'inhiber l'action de la trypsine. L'analyse des sucres de la glycoprotéine de cette molécule met en évidence, par rapport à une protéine de phénotype M isolée d'un sérum :

→ l'absence d'acide sialique et de galactose ;

→ une forte augmentation du mannose - $\approx$ le double de celui contenu dans la protéine de phénotype M - ;

→ en dépit de l'absence d'acide sialique, la protéine Z isolée du foie présente une micro-hétérogénéité en focalisation iso-électrique : en outre la migration du variant Z se situe à des pH_i très voisins de ceux du variant M désialylé.

Les auteurs proposent que l'origine de la micro-hétérogénéité de l' $\alpha 1$ AT ne résulte pas d'une différence qualitative et / ou quantitative en sucres mais d'une mutation ponctuelle d'un acide aminé de la chaîne polypeptidique - Cf. Yoshida et coll. (67) -.

* Sur le plan génétique, Eriksson, en 1964 (68), pré-senta le premier cas clinique d'une association entre un emphysème pulmonaire et un déficit quantitatif en $\alpha 1$ AT. Puis, Fagerhol et Braend (69), en utilisant une technique électrophorétique en gel d'amidon et en milieu acide, décrivent un système polymorphe dans les sérums étudiés ainsi au niveau de la zone pré-albuminique. En 1967, Fagerhol et Laurell (70) démontrèrent que ce système correspondait à la micro-hétérogénéité et au polymorphisme de l' $\alpha 1$ AT. Ils décrivirent alors pour la première fois qu'un état déficitaire était associé à la présence d'une protéine de migration plus lente que dans les sérums de sujets normaux témoins. Ils proposèrent de nommer ce phénotype ZZ et le système protéique sous le terme de "Protease inhibitor" ("Pi").

Depuis la description du système "Pi", ou $\alpha 1$ AT, des variants, ou phénotypes, nombreux ont été décrits, tant par électrophorèse en gel d'amidon en milieu pH acide que par la focalisation iso-électrique analytique en couche mince de gel de polyacrylamide en gradient 4-5 ou 4-6 (Cf. Figure 10 ci-après et Réf. 71 à 83).

Actuellement, l'identification et, partant, la nomenclature des phénotypes de l' $\alpha 1$ AT, sont bien codifiées grâce à la création du Comité International d'Etude du Système Pi. Lors de la dernière réunion de ce Comité (Rouen 1978), les principales méthodes électrophorétiques recommandées pour l'étude du système Pi ($\alpha 1$ AT) ont été les suivantes :

- l'électrophorèse en gel acide d'amidon selon Fagerhol (71),
- l'électrophorèse en gel d'acrylamide / agarose en milieu acide,
- l'électrofocalisation analytique avec contrôles par des techniques d'immuno-électrophorèse croisée et d'immuno-empreinte.

* En pathologie, de nombreuses associations entre un déficit quantitatif et / ou qualitatif en $\alpha 1$ AT et une maladie ou un syndrome, ont été décrites.

Pour éviter une énumération fastidieuse, nous présentons dans le **Tableau V**. (Cf. Annexe) ces maladies et ces syndromes dans lesquels un déficit en $\alpha 1$ AT a été prouvé.

VI. LES PROTEINURIES

* L'existence d'une protéinurie amène à rechercher l'origine de celle-ci.

Une protéinurie peut provenir

- * soit d'une modification de fonctionnement du glomérule,
- * soit d'une modification du fonctionnement de la portion tubulaire du néphron,
- * soit, enfin, d'un dysfonctionnement du glomérule et du tubule rénaux.

* Les méthodes d'étude des protéinuries sont celles déjà présentées en partie dans le premier chapitre de ce travail :

- * méthodes électrophorétiques et immuno-électrophorétiques,
- * dosages spécifiques de chacune des protéines urinaires - par immunodiffusion radiale, néphélométrie, radio-immunologie, méthode du "spot" à l'AMIDO SCHWARTZ 2, ou méthode de Lowry - méthode au biuret.

Toutes ces méthodes nécessitent une concentration préalable des urines par dialyse.

VI.1. Les protéinuries de type physiologique

* Elles sont caractérisées par la présence d'albumine en quantités faibles, 25 à 55% de l'ensemble des protéines, et de protéines d'un PM moyen (65 - 100 000 δ) et élevé (105 - 10⁶ δ ou plus).

La protéinurie totale est faible, en général inférieure à 100 μ g / mn.

VI.2. Les troubles de la filtration glomérulaire.

Les facteurs mis en jeu lors d'un dysfonctionnement du glomérule rénal sont essentiellement deux : des modifications des conditions hémodynamiques au niveau du glomérule et/ou des modifications de la barrière glomérulaire.

Une notion essentielle est l'évaluation de la sélectivité et elle est liée à la protéinurie. Cette sélectivité peut être appréciée soit par électrophorèse en gel de polyacrylamide agarose des urines concentrées au préalable ; soit par électrophorèse en gradient de polyacrylamide SDS.

C'est ainsi que l'on distinguera (44,45,46) :

- * une protéinurie de type glomérulaire sélectif caractérisée par la présence de protéines de PM moyen entre 65 et 100.000 δ parmi lesquelles on retrouve l'albumine, l' α 1 antitrypsine, la transferrine, en électrophorèse en gel de polyacrylamide agarose, et pratiquement rien au-delà sur les tracés.
- * une protéinurie de type glomérulaire non sélectif où les protéines sont de PM moyen ou élevé, $10^5 - 10^6$ ou plus.
- * une protéinurie de type glomérulaire peu sélectif, intermédiaire entre les deux types précédents, avec présence de protéines d'un PM moyen représentant environ 70 à 80 % de l'ensemble des protéines, et de protéines de PM élevé mais ne dépassant pas 150.000 δ .

VI.3. Les troubles de la fonction tubulaire.

Les protéinuries qui leurs sont liées se caractérisent par la présence de protéines de faible PM, inférieur à 65.000 δ .

Ces protéines sont :

- * les chaînes légères d'immunoglobulines,
- * la "Retinol-Binding-Protein" (47),
- * la β 2 microglobuline (48),
- * la " β trace" (49),

* d'autres protéines, qui peuvent être mises en évidence de manière plus inconstante : lysozyme (50) ou post-Y - globulines (51).

Il est important de souligner que la présence ou l'augmentation d'une protéine isolée, de faible PM, ne suffit pas pour diagnostiquer un dysfonctionnement tubulaire, seule l'augmentation conjointe des protéines de faible PM peut permettre de l'affirmer.

VI.4. Les troubles mixtes.

Ils se caractérisent par la présence simultanée de protéines de PM faibles, moyens et élevés. Une prédominance tubulaire, ou glomérulaire, peut être mise en évidence.

VI.5. Les protéinuries rencontrées lors des gammopathies (52,53,54,55)

Au cours des gammopathies, il est possible de détecter dans l'urine des malades le passage anormal du constituant monoclonal, intact ou en partie catabolisé ; l'existence d'une protéine de Bence Jones urinaire isolée ; ou bien les deux composants précédents en même temps.



En conclusion de ce rapide aperçu des protéinuries, il faut insister sur plusieurs points.

L'électrophorèse urinaire - immuno-électrophorèse, électrophorèse en polyacrylamide et en gradient de polyacrylamide SDS - est utile pour détecter une **néphropathie glomérulaire** surtout à son stade précoce.

Dans un certain nombre de cas - protéinurie normale en quantités mais avec anomalies qualitatives ; protéinurie orthostatique avec anomalies qualitatives ; néphropathie héréditaire, etc., l'électrophorèse des urines reste un excellent moyen de diagnostic de l'atteinte glomérulaire. Cependant, chez l'adulte, on notera que le degré de sélec-

tivité n'apporte aucune certitude sur la nature histologique des lésions glomérulaires.

Dans le cas de gammopathies, plus précisément des **myélomes**, les dosages spécifiques des différents constituants pathologiques présents dans les urines sont utiles dans l'estimation de la masse tumorale globale et la surveillance des traitements (56).

Annexe

&

Bibliographie

Tableau I. Propriétés physiques, chimiques et biologiques des Immunoglobulines humaines *

propriétés :	Ig G	Ig A	Ig M	Ig D	Ig E
Noms antérieurs	$\gamma, 7S\gamma, \gamma$	$\beta_2L, \gamma_2A, \gamma_2A$	$\gamma_{1M}, \beta_2M, 19S\gamma,$ $\gamma_M, \text{Macroglobul.}$	γ_D	Réagine ou γ_E
Forme moléculaire usuelle	monomère	mono-, dimère, etc.	pentamère	monomère	monomère
Formule moléculaire	$\kappa_2 \gamma_2$ ou $\lambda_2 \gamma_2$	$(\kappa_2 \alpha_2)_n$ $(\lambda_2 \alpha_2)_n$	$(\kappa_2 \mu_2)_5$ $(\lambda_2 \mu_2)_5$	$\kappa_2 \delta_2$ $\lambda_2 \delta_2$	$\kappa_2 \epsilon_2$ $\lambda_2 \epsilon_2$
Autres chaînes	—	«J»; «S»	«J»	—	—
Sous-classes	IgG 1, IgG 2, IgG 3, et IgG 4	IgA 1 et IgA 2	non précisée	aucune	aucune
chaînes lourdes : (H)	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	α_1, α_2	—	—	—
Allotypes des chaînes H	Gm (ca. 20)	Am (3)	Mm (2)	—	—
Poids moléculaire, PM	150.000	(160.000) _n	950.000	175.000	190.000
Cste sédimentation S ₂₀	6.6 S	7 S, 9 S, 11 S, 14 S	19 S	7 S	8 S
Hydrates carbone, %	3%	7%	10%	9%	13%
Taux sérique (adulte), en mg p. 100 ml	1.250 ± 300	210 ± 60	125 ± 50	= 4	= 0,03
en U.S.-I.	1,25 ± 0,3	0,21 ± 0,06	0,12 ± 0,05	= 0,004	= 0,00003
% sur Protides totaux	75 - 85 %	7 - 15 %	5 - 10 %	0,3 %	0,003 %
"Pool" circulant total mg / kg poids corporel	494,0	95,0	37,0	1,1	0,019
Durée de vie (t _{1/2} jrs)	23 jrs	5,8 jrs	5,1 jrs	2,8 jrs	2,5 jrs
Rythme de biosynthèse, mg / kg pds corpor. / jr.	33,0	24,0	6,7	0,4	0,016
Gammopathie Groupe 1.	myélome	myélome	Syndrome lympho- prolifératif.	myélome	myélome
Valence Anticorps	2	2	5 ou 10	?	?
Propriétés sérologiques	Précipitation ; Antitoxines.	Précipitation & Antivirales.	Agglutination ; Hémagglutination HémoLyse ; Antivirales.	Antivirales	non mesurée
Fixation du Complément	IgG 1, IgG 2, IgG 3	—	la plupart IgM	?	—
Activation Complément	IgG 4	IgA 1, IgA 2	—	?	IgE
Cellules de fixation	macrophages.	—	—	?	mastocytes
Autres propriétés biologiques	Réponse Anti- corps secondaire Transfert placentaire.	Anticorps spécifique des secrétions muqueuses.	Réponse Anti- corps primaire, Facteur rhumatoïde.	?	Anticorps homocyto- trophique ; Anaphylaxie Allergie.

* Reproduit et traduit de W.F. PUTNAM, In : The Proteins, 1975, page 17, Table IV.

Nombre des restes acides aminés
0 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600

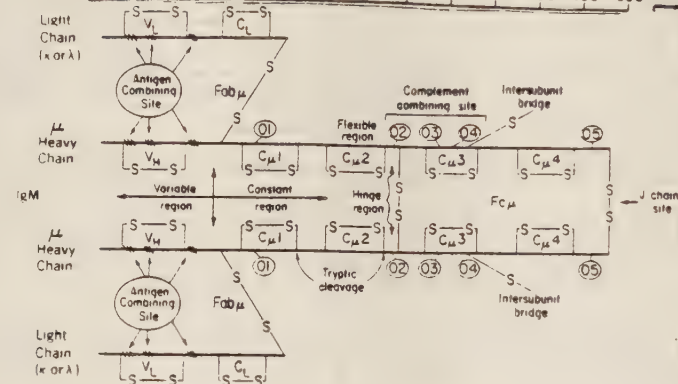
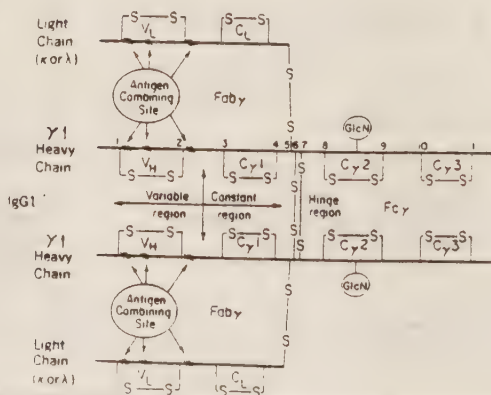
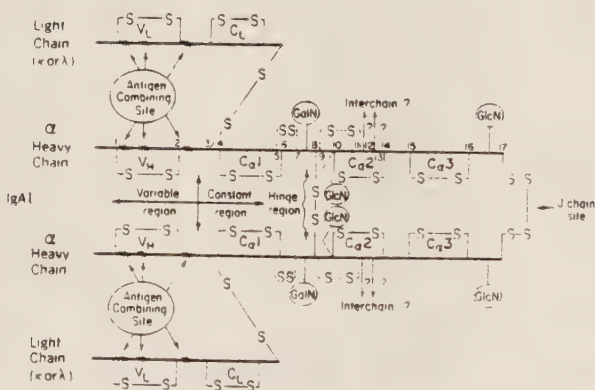


Tableau II.
In.: F.W.PUTNAM
III, 1977, 27.
Modèles schéma-
tiques de struc-
ture des monomè-
res IgM, IgA1
et IgG1 humain-
es.

Antigen
Combining Site.
= Site Anticorps



Immunoglobulines humaines normales

Protéines de Bence- Jones	moins concentrées				
	principales				
PBJ	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
κ —	κ —	$\left(\begin{array}{c} \kappa \\ \gamma \\ \alpha \end{array} \right)_2$	$\left(\begin{array}{c} \kappa \\ \mu \end{array} \right)_3$	κ —	κ —
κ —	κ —	$\left(\begin{array}{c} \kappa \\ \gamma \\ \alpha \end{array} \right)_2$	$\left(\begin{array}{c} \kappa \\ \mu \end{array} \right)_3$	κ —	κ —
κ —	κ —	$\left(\begin{array}{c} \kappa \\ \gamma \\ \alpha \end{array} \right)_2$	$\left(\begin{array}{c} \kappa \\ \mu \end{array} \right)_3$	κ —	κ —
κ or κ_2	$\kappa_2 \gamma_2$	$(\kappa_2 \alpha_2)_2$	$(\kappa_2 \mu_2)_3$	$\kappa_2 \delta_2$	$\kappa_2 \epsilon_2$
λ —	λ —	$\left(\begin{array}{c} \lambda \\ \gamma \\ \alpha \end{array} \right)_2$	$\left(\begin{array}{c} \lambda \\ \mu \end{array} \right)_3$	λ —	λ —
λ —	λ —	$\left(\begin{array}{c} \lambda \\ \gamma \\ \alpha \end{array} \right)_2$	$\left(\begin{array}{c} \lambda \\ \mu \end{array} \right)_3$	λ —	λ —
λ —	λ —	$\left(\begin{array}{c} \lambda \\ \gamma \\ \alpha \end{array} \right)_2$	$\left(\begin{array}{c} \lambda \\ \mu \end{array} \right)_3$	λ —	λ —
λ or λ_2	$\lambda_2 \gamma_2$	$(\lambda_2 \alpha_2)_2$	$(\lambda_2 \mu_2)_3$	$\lambda_2 \delta_2$	$\lambda_2 \epsilon_2$

Tableau III. In : W.F. PUTNAM, III, 1977, p.26

Structure des immunoglobulines humaines
et des protéines de Bence-Jones.

Les chaînes légères sont désignées par κ et λ ,
Les chaînes lourdes par les lettres $\gamma, \alpha, \mu, \delta$, et ϵ

Les traits "flous" représentent les portions
variables des chaînes.

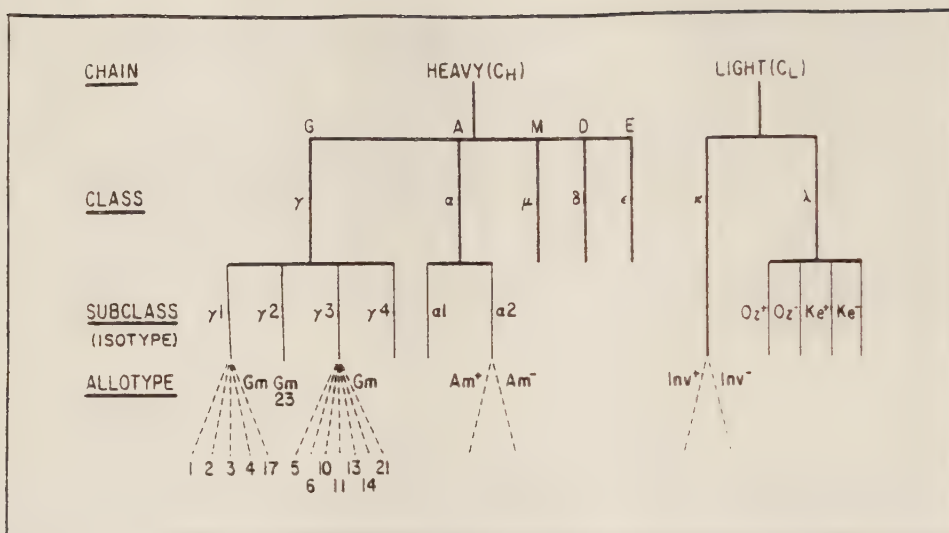


Tableau IV. In : W.F. PUTNAM, III, 1977, p. 36

Classes, sous-classes et allotypes
des régions constantes des chaînes lourdes
et des chaînes légères des immunoglobulines humaines.

HEAVY CHAIN (C_H) = CHAÎNES LOURDES (PORTION CONSTANTE)

LIGHT CHAIN (C_L) = CHAÎNES LÉGERES (PORTION CONSTANTE)

SUBCLASS (ISOTYPE) = SOUS-CLASSES

Remarque : Les abréviations Ke⁺ et Ke⁻ désignent
les isotypes Kern (Putnam 1972)

Tableau V. (d'après Ph. ARNAUD, Ph.D.Thesis, p.89, 1977 (58) modifié selon les références indiquées (Cf. Bibliographie).

Corrélations entre affections pathologiques et déficits génétiques ou quantitatifs en $\alpha 1$ antitrypsine.

Affections pathologiques	Type du déficit en $\alpha 1$ antitrypsine	Références (Bibliographie)
Emphysème pulmonaire	allèle Z : homozygotes ZZ hétérozygotes Z -	(84)
Asthme bronchique	Idem	(85)
Bronchite chronique	Idem	(85)
Asthme infantile non allergique	différents phénotypes déficitaires en $\alpha 1$ AT	(86)
Mucoviscidose	diminution des taux sériques en $\alpha 1$ AT dans des familles de sujets porteurs de cette affection.	(87)
Cholestase intra-hépatique néonatale	allèle Z : homozygotes ZZ hétérozygotes Z -	(89, a à e)
Atrésie des voies biliaires intra-hépatiques	homozygotes ZZ	(90, a & b)
Hémochromatose	homozygotes ZZ hétérozygotes MZ	(91)
Hépatomes	Idem	(92, a à d)
Cirrhose hépatique de l'adulte	allèle Z : homozygotes ZZ hétérozygotes Z -	(93)

.../..

<u>Affections pathologiques</u>	<u>Type du déficit en $\alpha 1$ antitrypsine</u>	<u>Références (Bibliographie)</u>
Glomérulonéphrites membranoprolifé- ratives.	homozygotes ZZ	(94)
Affections inflammatoires chroniques peri- odontales	sujets hétérozygotes porteurs de l'allèle Z	(95)
Aberrations chromo- somiques (mosaïques et Trisomie 21)	phénotypes défici- taires	(96)
Polyarthrite chro- nique juvénile	phénotypes déficitaires	(97)

Bibliographie

(1. F.W. PUTNAM

In : "The Plasma Proteins. Structure, Functions
"and Genetic Control", Vol.III, 1977, p.93-99
Academic Press, N.Y., 2nd edition.

(2. A.G. PLAUT, J.V. GILBERT, M.S. ARTENSTEIN, J.D. CAPRA
Science 190, 1103, 1975

(3. F.W. PUTNAM

In : Référence (1.: p.99

(4. C.B. LAURELL

In : XXIIInd Colloquium on Protides of biological fluids
H.Peeters, Oxford, editor, 1974, 3-12

(5. F.W. PUTNAM

In : Référence (1. : 91-93

(6. J.V. WELLS, J. BLEUMERS, H.H. FUDENBERG

Proc.Nat.Acad.Sci.USA 70, 827, 1973

(7. F.W. PUTNAM

In : Référence (1. : 90-91

(8. F.W. PUTNAM

In : Référence (1. : 34-38

(9. R. JEFFERIS

Immunol.Comm. 4, 477, 1975

(10. H. BENNICH, S.G.O. JOHANSSON, H.Von BAHR-LINDSTROM,
T. KARLSSON

"Molecular and biological aspects of the acute allergic
"reaction." pp.175-197

In : Nobel Foundation Symposium ..

S.G.O. JOHANSSON, K. Strandberg, B. Uvnas, Editors,

Plenum Press, New York, 1976

- (11. A. SOLOMON
New Engl. J. Med. 294, 91, 1976
- (12. F.W. PUTNAM
In : Référence (1. : 49-76
- (13. E.C. FRANKLIN, J. LOWENSTEIN, B. BIGELOW, M. MELTZER
Amer. J. Med. 37, 332, 1964
- (14. E.C. FRANKLIN, M. MELTZER, F. GUGGENHEIM, J. LOWENSTEIN
Fed.Proc. of Fed.Amer.Soc.Exper.Biol. 22, p 619, 1963
- (15. M. SELIGMANN, F. DANON, D. HUREZ, E. MIHALESCO,
J.L. PREUD'HOMME
Science 162, 1396, 1968
- (16. F.A. FORTE, F. PRELLI, W.J. YOUNT
Blood 36, 137, 1970
- (17. F.W. PUTNAM
In : Référence (1. : 131-135
- (18. J. HIRSCHFELD
Acta Path.Microbiol.Scand. 47, 160, 1959
- (19. B.H. BOWMAN,
Biochemistry 8, 4327, 1969
- (20. K. HENNINGSSEN (cited by F.W. PUTNAM)
In : Référence (1. 343-344
- (21. F.W. PUTNAM
In : Référence (1. : 348-350
- (22. J. CONSTANS, H. CLIVE
"Specific Group-components"
a.Report to 1st Intern.Workshop, Collège de France,(Paris)
VII, 27-28, 1978
b.Human Genet. 48, 143-149, 1979
- (23. S.P. DAIGER, M.S. SCHANFIELD, L.L.CAVALLI-SFORZA
a. Amer. J. Hum. Gent. 26, 24A, 1974
b. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72, 2076 , 1975

- (24. H. Van BAELEN, R. BOUILLON, P. de MOOR
J. Biol. Chem. 253, 6344-45, 1978
- (25. C.G. HOLMBERG, C.B. LAURELL
Acta Physiol. Scand. 10, 307, 1945
- (26. F.W. PUTNAM
In : "The Plasma Proteins. Structure, Functions
" & Genetic Control.", Vol. I., pp.265-316, 1975
- (27. P. KUHNLE, W. SPIELMANN
Hum.Genet. 43, 91-95, 1978
- (28. H.E. SUTTON, G. JAMIESON
In : "The Glycoproteins, their composition, structure
" and function"
A.Gottschalk editor, BBA Library, Vol 5, Part A, p.653
Elsevier, Amsterdam, publisher, 1972
- (29. F.W. PUTNAM
In : The Plasma proteins. Structure, Functions
and Genetic control., Vol I., pp.92, 1975
- (30. F.W. PUTNAM
In : Référence précédente : pp. 1-50
- (31. J.V. PASTEWKA, A.T. NESS, A.C. PEACOCK
Biochem.Biophys.Acta 386, 530-537, 1975
- (32. A.C. PEACOCK, J.V. PASTEWKA, R.A. REED, A.T. NESS
Biochem. 9, 2275, 1970
- (33. Z. PAVLICEK, R. JAENICKE
Eur. J. Biochem. 18, 305-312, 1971
- (34. H. TSUNOO, T. SASAZUKI, H. SATO, H. NAKAJIMA
Immunochem. 11, 673-679, 1974
- (35. T. SASAZUKI, H. TSUNOO, H. NAKAJIMA, K. IMAI
J. Biol. Chem. 249, 2441-2446, 1974
- (36. P.K. HWANG, J. GREER
J. Biol.Chem. 254, 2265-2270, 1979
- (37. M.K. FAGERHOL, J.H. JACOBSEN
Vox Sanguis 17, 143-145, 1969

(38. M.K. FAGERHOL

In : XVIIth Coll. on Prot. Biol. Fluids, Bruges, 1969,
H.Peeters, editor, Pergamon Press, Oxford, 1970, 357-359

(39. M. THYMAN, K. HENNINGSSEN

Hum.Hered. 25, 501-505, 1975

(40. J. CONSTANS, M. VIAU

Amer. J. Hum. Genet. 29, 280-286, 1977

(41. J. CONSTANS, P. RICHARD, M. VIAU

Hum.Hered. 28, 328-334, 1978

(42. O. HEVER, A. HAJPAL

Hum.Hered. 28, 100-103, 1978

(43. H.E. SUTTON

Revue sur la Génétique de l'Haptoglobine

In : "Progress in Medical Genetics"

A.G.Steinberg, A.G.Bearn, editors, Vol 7, pp 163-216
Greene and Stratton, New York, 1970

(44. Y. MANUEL, J.P. REVILLARD, H. BETUEL, editors

"Proteins in normal and pathological urine"

Karger, Basel, publisher, 1970

(45. Y. MANUEL, A. COLLE

"Protéinurie"

Monographie du Centre de Documentation Behring, 1978

(46. R. GALLI, A. CHAVAZ, L. BALANT, F. CHATELANAT,

J. FABRE

Schweiz.med.Wschr. 109, 874-880, 1979

(47. F.W. PUTNAM

In : "The Plasma Proteins. Structure, Functions

" and Genetic Control" Vol.I, p.72-74, 1975

Academic Press, N.Y.publisher

(48. Colloque européen sur la β_2 microglobuline, Lyon, 1977

Path.Biol. 26, 279-394, 1978

(49. H. LINK

a. "Proteins in normal and pathological urines"

In : XIIIth Coll.Prot.Biol.Fluids, H.Peeters, editor, 1965

b. Acta Neurol.Scand. 43, 28, 7, 1967

- (50. C. TONNELLE, A. COLLE, M. LECLERCQ, J. SIRE,
Y. MANUEL
Biochim.Biophys.Acta 490, 35-43, 1977
- (51. C. TONNELLE, A. COLLE, M. FOUGEREAU, Y. MANUEL
Biochim.Biophys.Acta 86, 613-619, 1979
- (52. L. MOREL-MAROGER, M. BEAUFILS, G. RICHET
"Le rein des dysprotéïnémies"
In : Néphrologie, J.Hamburger, J.Crosnier, J.P.Grünfeld
pp.733-749, Flammarin Edit.,Paris, 1979
- (53. R. CREYSSEL
In : Proteins in Normal and Pathological Urine
Y.Manuel, J.P. Revillard, H.Bethuel, edit. pp.100-110
Karger, Basel, publish., 1970
- (54. J.M. FINE
In : Référence précédente : pp.92-99
- (55. A. SOLOMON
New Engl. J. Med. 294, 91, 1976
- (56. P.W. COLE, B.G.M. DURIE, S.E. SALMON
J. Immunol. Meth. 19, 341, 1978
- (57. H.F. BUNDY, J.W. MEHL
J. Biol.Chem. 234, 1124-1128, 1959
- (58. Ph. ARNAUD
Ph. D. Thesis, Medical University of South Carolina,USA,1977
Chap.III, 48-58
- (59. J.O. JEPSSON, C.B. LAURELL, M. FAGERHOL
Europ. J. Biochem. 83, 143-153, 1978
- (60. M. MORIC, S. ODANI, T. KOIDE, T. IKENAKA
J. Biochem. 83, 269-277, 1978
- (61. N. HEIMBURGER, H. HAUPT, H.G. SCHWICK
In : Proc. International Research Conference
on Proteinase Inhibitors. pp.1-21
H.Fritz,H.Tschlesche, editors
Walter de Gruyter, Berlin, 1971

- (62. R. PANNELL, D. JOHNSON, J. TRAVIS
J. Biol.Chem. 13, 5439-5445, 1974
- (63. J. TRAVIS, D. JOHNSON
Biochem.Biophys.Res.Comm. 84, 219-224, 1978
- (64. D. SHOCHAT, S. STAPLES, K. HARGROVE, J.S. KOZEL
J. Biol.Chem. 253, 5630-5634, 1978
- (65. S.K. CHAN, D.C. REES, S.C. LI, Y.T. LI
J. Biol.Chem. 251, 471-476, 1976
- (66. A. HERCZ, E. KATONA, E. CUTZ, J.R. WILSON, M. BARTON
Science 201, 1229-1232, 1978
- (67. A. YOSHIDA, J. LIEBERMAN, L. GAIDULIS, C. EWING
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73, 1324-1328, 1976
- (68. S. ERIKSSON
Acta Medica Scandinavia 175, 197, 1964
- (69. M.K. FAGERHOL, M. BRAEND
Science 149, 986-987, 1965
- (70. M.K. FAGERHOL, C.B. LAURELL
Clinica Chimica Acta 16, 199-203, 1967
- (71. M.K. FAGERHOL
Series Haematol. 1, 153-161, 1968
- (72. C. CHAPUIS-CELLIER
Thèse Doctorat d'Etat en Médecine,
Université Claude Bernard Lyon I, 1975
- (73. R.C. ALLEN, R.A. HERLEY, R.C. TALAMO
Amer. J. Clin.Pathol. 62, 732-739, 1974
- (74. R.R. FRANTS, A.W. ERIKSSON
Hum.Hered. 26, 435-440, 1976
- (75. R.R. FRANTS, A.W. ERIKSSON
Hum.Hered. 28, 201-209, 1978
- (76. R.R. FRANTS, G.T. NOORDHOEK, A.W. ERIKSSON
Scand. J. Clin.Lab.Invest. 38, 457-462, 1978

- (77. T. GENZ, J.P. MARTIN, H. CLEVE
Hum.Genet. 38, 325-332, 1977
- (78. F. KUEPPERS
Amer. J. Hum.Genet. 28, 370-377, 1976
- (79. F. KUEPPERS, M.J. CHRISTOPHERSON
Amer. J. Hum.Genet. 30, 359-365, 1978
- (80. J.O. JEPSSON
In : "Electrofocusing and Isotachopheresis" (Hambourg, 1976)
B.J.Radola, D.Graesslin, editors
Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1977, pp.273-279
- (81. J.A. PIERCE, J.O. JEPSSON, C.B. LAURELL
Analyt.Biochem. 74, 227, 1976
- (82. P. KUHN
Elektrofokussierung in der Forensischen Serologie
LKB Instruments GmbH, pp.35-41, 1979
- (83. a. D.W. COX
Am.J.Hum.Genet. 30(6), 660-662, 1978
b. P. ARNAUD, R.M. GALBRAITH, G.M.P. GALBRAITH,
R.C. ALLEN, H.H. FUDENBERG
Amer. J. Hum.Genet. 30, 653-659, 1978
- (84. S. ERIKSSON
Acta Medica Scandinavia (Suppl.175) 177, 1-85, 1965
- (85. M.K. FAGERHOL, H.E. HAUGE
Acta Allerg. 24, 107, 1969
- (86. P. ARNAUD, C. CHAPUIS-CELLIER, G. SOUILLET, P. CARRON,
G.B. WILSON, R. CREYSSEL, H.H. FUDENBERG
Trans.Ass.Amer.Phys. 89, 205-214, 1977
- (87. H.L. SHARP, K.A. HORNING, R.K. MATHIS
In : "Clinical morphology and preliminary biochemical and
"immunologic studies of α 1 AT and the liver. Cystic
"fundamental problems in cystic fibrosis and related
"diseases." pp.229-246
J.A.Mangos, R.C.Talamo, editors.
Intercontinental Medical Book Corporation, N.Y., 1973

- (88. A..RODA, Thèse Doctorat en Médecine, LYON I 1978
- (89. a. H.L. SHARP, R.A. BRIDGES, W. KRIVIT, E.F. FRIER
J. Lab.Clin.Med. 73, 934-939, 1969
b. O. AAGENAES, A. MATLARY, K. ELGO, E. MUNTHE,
M.K. FAGERHOL
Acta Paediatrica Scandinavia 61, 632-642, 1972
c. H. GANS, H.L. SHARP, B. TAN
Surg.Gynec.Obstet. 129, 289-299, 1969
d. A.M. JOHNSON, C.A. ALPER
Pediatrics 46, 921-924, 1970
e. A. MILFORD-WARD
In : XXIIInd Coll.Prot.Biolog.Fluids, H.Peeters, edit.521-525
Pergamon Press, Oxford, N.Y., 1975
- (90. a. H. CHRISTEN, J. BAU, H. HALSBAND
Klin.Wschr. 53, 90-91, 1975
b. L. CREST, C. CHAPUIS-CELLIER, P. ARNAUD, C. BERGER,
R. CREYSSEL
 $\alpha 1$ antitrypsin and Pl sytem.
Colloque INSERM 1975 pp.121-130
- (91. E.D. JANUS, R.W. CARRELL
 $\alpha 1$ AT deficiency and adult liver disease
In : XXIIInd Coll.Prot.Biol.Fluids, H.Peeters, editor
Pergamon Press, N.Y., 383-385, 1976
- (92. a. S. ERIKSSON, J. HAGERSTRAND
Cirrhosis and malignant hepatoma in $\alpha 1$ AT deficiency
Acta Medica Scandinavia 195, 651-658, 1974
b. W. RAWLINGS, J. MOSS, H.S. COOPER, S.R. HAMILTON
Hepatocellular carcinoma and partial deficiency of $\alpha 1$ AT(MZ)
Ann.Int.Med. 81, 771-773, 1974
c. J. LIEBERMAN, R.M. SILTON, C.M. AGLIOZZO,
J. McMAHON
Hepatocellular carcinoma and intermediate $\alpha 1$ AT (MZ)
Amer. J. Clin.Pathol. 64, 304-310, 1975
d. L.A. SCHLEISSMER, A.M. COHEN
 $\alpha 1$ AT deficiency and hepatic carcinoma
Amer.Rev.Resp.Dis. 111, 863-868, 1975
- (93. E.D. JANNUS, R.W. CARRELL
In : Référence (91.

- (94. S.P. MOROZ, E. CUTZ, J. WILLIAMSON-BALFE,
A. SASS-KORTSAK
Pediatrics 57, 232-238, 1976
- (95. R.J. PETERSON, C.L. MARSH
J. Peridodontol. 50, 31-35, 1979
- (96. R.M. FINEMAN, K.K. KIDD, A.M. JOHNSON, W.R. BREG
Nature 260, 320-321, 1976
- (97. Ph. ARNAUD, R.M. GALBRAITH, W.P. FAULK, B.M. ANSELL
J. Clin. Invest. 60, 1442-1444, 1977
-

Chapitre III

Résultats expérimentaux

Avant de présenter les résultats expérimentaux obtenus en immuno-empreintes avec différentes protéines sériques ou urinaires, il nous semble nécessaire d'insister sur les notions de polymorphisme et de microhétérogénéité.

* On parle de polymorphisme pour une protéine donnée, à l'intérieur d'une espèce donnée, lorsqu'il peut exister des expressions différentes de cette protéine pour des individus appartenant à la même espèce. Le polymorphisme est, bien entendu, d'origine génétique.

* Chez un individu donné, une protéine peut présenter, avec des techniques très fines d'analyse comme la focalisation iso-électrique, une structure hétérogène. Il n'existe pas, en principe, de différences chimiques ou immunologiques entre les différentes bandes d'une telle structure : on parle de microhétérogénéité. Pour l'expliquer, nombre d'hypothèses ont été discutées.

* Le rôle éventuel des sucres, en particulier des acides sialiques : cependant, la désialylation par la neuraminidase ou par une hydrolyse acide ménagée, montre que la microhétérogénéité est le plus souvent conservée.

* D'éventuelles modifications chimiques au niveau de certains résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique, par exemple une dé-amination $-CO-NH_2 \rightarrow -COOH$, et une telle hypothèse ne doit pas être écartée pour certaines protéines.

* D'éventuelles modifications de la composition en acides aminés, d'une bande protéique à l'autre : de telles modifications n'entraîneraient pas de changements dans les propriétés antigéniques et biologiques de la molécule protéique mais seulement dans les charges de la molécule, expliquant ainsi la structure dite "multibandes" observée en

focalisation iso-électrique.

Cependant, il faut noter que, dans certains cas, une structure "multibandes" a été décelée en focalisation iso-électrique et cette "micro-hétérogénéité" était liée à une interaction macromolécule-ampholytes porteurs ; enfin, une "micro-hétérogénéité" peut apparaître lorsque les conditions d'équilibre ne sont pas réalisées en focalisation iso-électrique.

Les Immunoglobulines

I. Les immunoglobulines A - Ig A -

Les immunoglobulines peuvent se présenter, nous l'avons vu, sous différentes formes moléculaires.

L'électrofocalisation analytique en gradient de pH 4 - 6,5 donne les résultats présentés Figure 1, pour dix sérums différents de malades présentant une gammapathie Ig A. Les images sont donc celles d'Ig A monoclonales.

Une immuno-empreinte, réalisée sur ce même type de gel de migration, conduit aux résultats de la Figure 2, obtenus sur cinq sérums différents.

Il est certain que ces résultats peuvent être considérablement améliorés en utilisant l'électrofocalisation en gel d'agarose. Ces études sont en cours actuellement.

Figure 1 IgA monoclonales sériques.

Electrofocalisation analytique en couche mince
de polyacrylamide.

Gradient : 4 - 6,5 (PHARMALYTES)

Durée de la focalisation :

4 h. (1 h. de préfocalisation)

25 W

1.200 V

Figure 1. IgA monoclonales. Electrofocalisation.



Figure 2. Ig A monoclonales.

Immuno-empreintes réalisées sur les cinq premiers gels d'électrofocalisation de la Figure 1.

Membranes : Acétate de cellulose
(Sepraphore III, GELMAN)

Antisérum anti-Ig A (chaîne lourde) (DAKO)

Durée de l'immuno-empreinte : 30 mn.

Rappel concernant toutes nos immuno-empreintes :

La coloration des membranes - après des lavages répétés à l'aide de solutions aqueuses de chlorure de sodium 0,15 M - s'effectue soit par une solution de rouge ponceau, soit par le bleu brillant Coomassie R250 .

Figure 2. Ig A monoclonales. Immuno-empreintes effectuées sur les cinq premiers sérums électro-focalisés en gel de polyacrylamide 4-6,5 Fig.1.



II. Les immunoglobulines G - IgG -

Les immunoglobulines G monoclonales sériques présentent, après électrofocalisation, un aspect en multibandes connu depuis longtemps.

Nous n'insisterons pas sur les différentes hypothèses formulées pour expliquer cet aspect électrophorétique inattendu pour des protéines monoclonales : variations de la teneur en acide sialique, ou désialylation ; dé-amidation ; protéolyse partielle ; équilibres conformationnels, etc.

L'électrofocalisation analytique des IgG monoclonales avec gel en couche mince de polyacrylamide pose un problème pratique de ces protéines dans le gel lors des dépôts des échantillons (Cf Chapitre I. Tableau V. p.26). Les dépôts sont en effet effectués à l'aide de papiers découpés aux dimensions convenables. Les résultats obtenus avec cette technique d'inclusion sont très irréguliers et conduisent souvent à des traînées dans le gel et à l'absence, en définitive, de phénomène de focalisation iso-électrique. Nous avons récemment, au laboratoire, entrepris un travail sur ce sujet. Nous ne présenterons ici que des résultats obtenus avec un mode de dépôt classique sur papier-filtre. Il faut d'ailleurs noter que le même problème pratique d'inclusion se pose pour les immunoglobulines A (Figure 1. Ig A)

Pour différents sérums de malades porteurs soit d'une gammopathie IgG κ , soit d'une gammopathie IgG λ , l'électrofocalisation analytique sur gel en couche mince de polyacrylamide (T = 5% - C = 3%) a été suivie d'immuno-empreintes réalisées à l'aide d'antisérums monospécifiques anti-chaîne lourde H γ puis anti-chaîne légère κ ou λ selon le type de la gammopathie monoclonale. Les résultats sont présentés dans les Figures 1. & 2. IgG κ monoclonales Dj. et So. puis dans les Figures 3. & 4. IgG λ monoclonales Fe. et Le.

Figures 1. 2. 3. 4. IgG κ et IgG λ monoclonales.

Figures 1 et 3.

Electrofocalisations analytiques

Gels de polyacrylamide en gradient 6-11
(AMPHOLINES LKB)

Dépôt anodique des échantillons.

Dilution préalable des sérums au 1 / 3 avec
de l'eau distillée.

Paramètres de la migration :

préfocalisation 1 h 30 W 1 200 V

focalisation 3 h 25 W 1 200 V

Figures 2 et 4.

Immuno-empreintes des chaînes H γ et légères κ et λ .

Les sérums ont été dilués avec de l'eau
distillée selon les taux indiqués pour
chaque malade (Dj. et So. d'une part, Fe. et
Le. d'autre part)

Les membranes étaient dans tous les cas :
acétate de cellulose Sepraphore III (GELMAN)

Antisérums monospécifiques anti-H γ purs
et anti- κ ou anti- λ purs (BEHRING, RFA)

Durée du contact : 1 heure.

Figure 1. Ig G x . Electrofocalisation analytique.

Sérums dilués au 1/3. Gradient 6 - 11 (AMPHOLINES LKB)

Les Ig G x Dj. (2) à gauche et So. (4), à droite, sont nettes.



Figure 2. Ig G x monoclonaux. Immuno-empreintes.

Les dilutions sont au $1/3$, $1/4$ et $1/5$ èmes pour So.
et de $1/2$ et $1/3$ pour Dj.

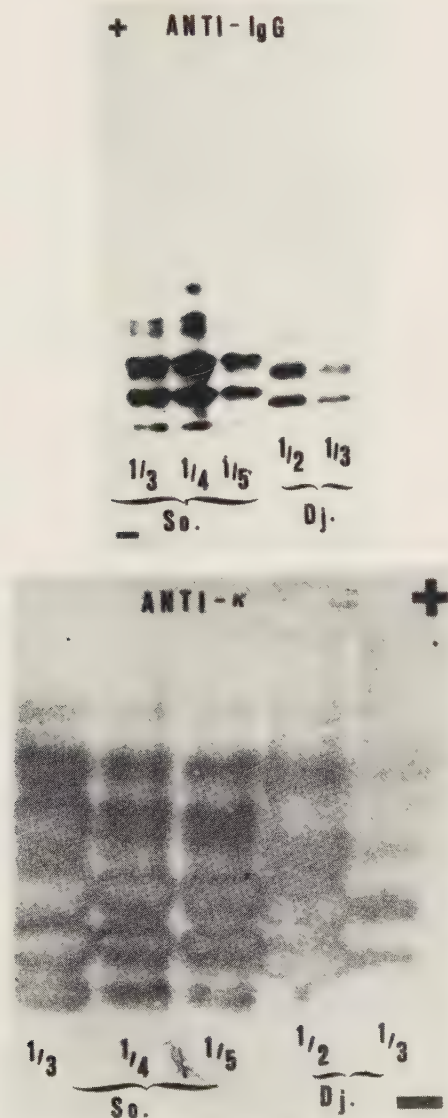


Figure 3. IgG λ monoclonales. Electrofocalisation.

Fe., Le. indiquent les gels des immuno-empreintes Fig.4.

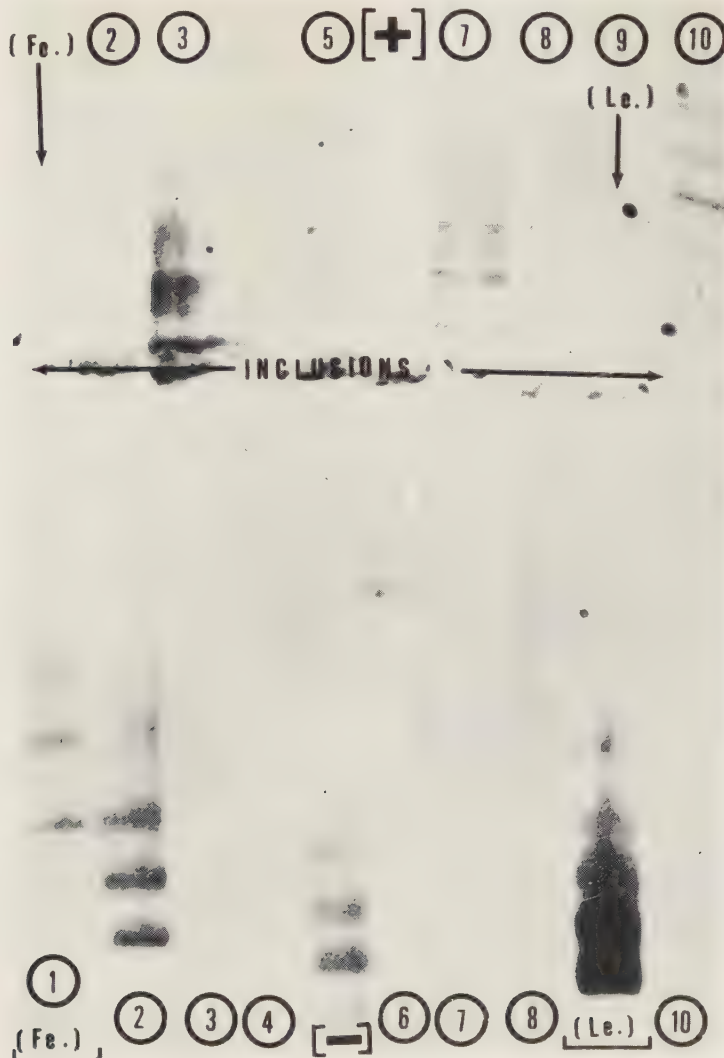
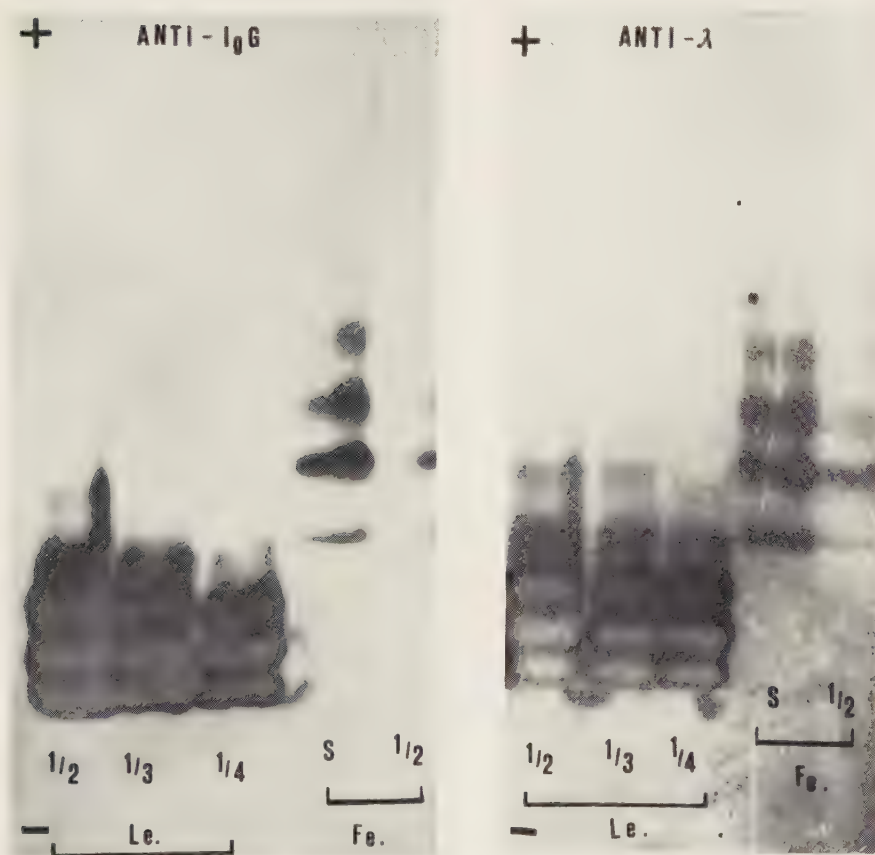


Figure 4. Ig GA monoclonales. Immuno-empreintes.

Les dilutions , pour Le. sont aux $1/2$, $1/3$, $1/4$ et, pour Fe. au $1/2$ et 0 (S, anti-sérum entier.).



III. Les protéines des maladies des chaînes lourdes $H\gamma$

Les protéines des maladies des chaînes lourdes $H\gamma$ présentent, classiquement, en gel de polyacrylamide, une grande hétérogénéité.

L'électrofocalisation analytique en gel en couche mince de polyacrylamide en gradient de pH 3,5 - 10 d'une protéine $H\gamma$ de maladie de Franklin (Co.) a été effectuée avant une immuno-empreinte sur acétate de cellulose et les résultats de cette dernière sont montrés page suivante.

On notera, sur la figure, la très grande hétérogénéité de cette protéine : elle couvre en effet, en migration électrophorétique, un très large gradient de pH. Des études sont en cours actuellement sur différentes protéines de maladie de Franklin ou protéines $H\gamma$ découvertes au Laboratoire et ceci par diverses techniques électrophorétiques : électrofocalisation, électrofocalisation combinée avec l'électrophorèse (courbes de titration acido-basique des protéines) ; électrofocalisation suivie d'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS, etc. pour essayer de préciser les caractéristiques de cette extraordinaire hétérogénéité des protéines des maladies des chaînes lourdes.

Figure H_γ Co. Etude de la protéine dans les urines.

Electrofocalisation sur gel en couche mince de polyacrylamide réalisée sur les urines contenant la protéine :

gradient de pH : 3,5 - 10

conditions de migration : 25 W 950 - 1 000 V

En A. : gel sur lequel a été réalisée l'immuno-
empreinte - après des lavages répétés en
solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M -
en utilisant le bleu brillant Coomassie R 250
comme colorant.

En B. : immuno-empreinte - membrane acétate de cellulose
Sepraphore III, GELMAN
- antisérum anti H_γ DAKO pur

H₂ Co. Etude des urines.



Les protéines de Bence - Jones

Les protéines de Bence-Jones, nous l'avons vu dans le Chapitre II de ce travail, présentent une spécificité antigénique soit α soit λ .

Les migrations électrophorétiques en gel d'acrylamide varient considérablement d'une protéine de Bence-Jones à une autre. Ces protéines peuvent également présenter un aspect électrophorétique dit "en multibandes".

Nous ne représenterons ici, page suivante, que des immuno-empreintes réalisées après électrophorèses en gel de polyacrylamide-agarose. Ce type de gel est communément utilisé au laboratoire pour l'analyse des protéïnuries.

L'immuno-empreinte peut devenir nécessaire pour trancher sur l'existence d'une protéine de Bence-Jones sérique ou urinaire, lorsque, à la fois, l'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse donnent un résultat douteux.

Qui plus est, l'immuno-empreinte s'avère, dans certains cas, indispensable pour mettre en évidence une protéine de Bence-Jones si la migration électrophorétique de celle-ci coïncide avec celle d'un constituant urinaire rencontré dans les tracés glomérulaires, tubulaires ou mixtes, par exemple une $\beta 2$ microglobuline ou l'haptoglobine.

Le gel d'électrofocalisation et les immuno-empreintes que montre notre iconographie, page suivante, concernent une protéine de Bence-Jones λ - PBJ λ - myélomateuse (Hu.)

Figure PBJ λ Hu. Etude de la protéine dans l'urine.

A. En haut : Electrofocalisation en gel de polyacryl-
amide - agarose

Urine concentrée par dialyse
et rediluée au 1/10.

Conditions :

B. En bas : Immuno-empreinte

membrane acétate de cellulose Sepharose III

Antisérum anti- λ DAKO

aux dilutions successives de

état pur : empreinte (0)

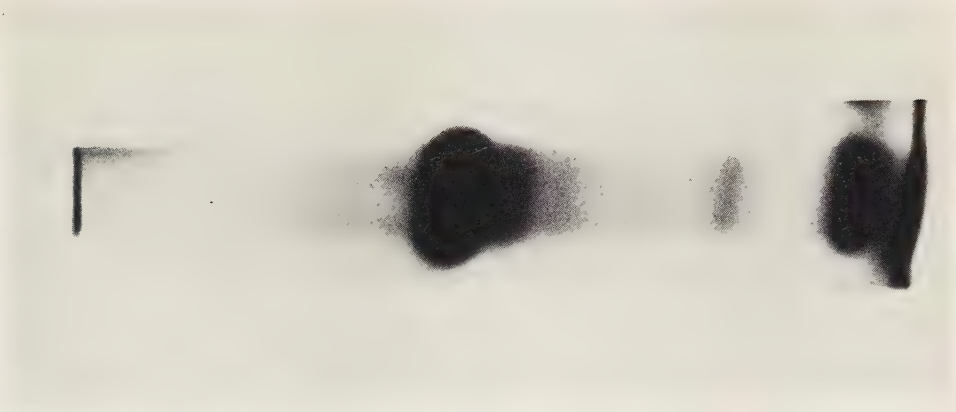
1 / 2 : empreinte (1)

1 / 3 : empreinte (2)

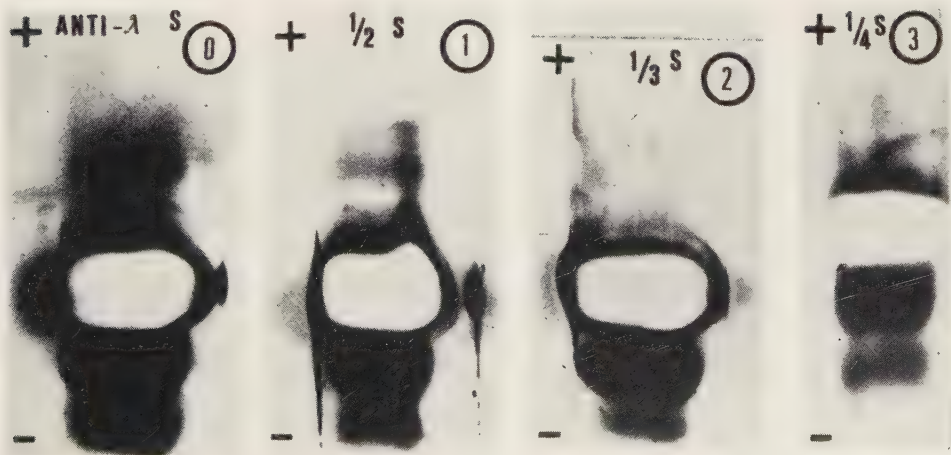
1 / 4 : empreinte (3)

Durée de contact de l'empreinte : 1 heure.

PBJA Hu. Etude de la protéine dans l'urine.



Immuno-empreinte :



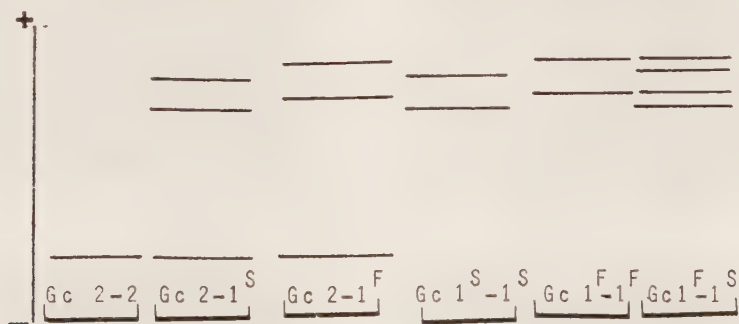
Les Groupes Gc

(ou "Group - Components")

Nous avons vu, dans le Chapitre II de ce travail , que le polymorphisme des groupes Gc est basé sur l'existence de trois phénotypes principaux décelables en électrophorèse, à savoir Gc 1-1, Gc 1-2 et Gc 2-2.

L'électrofocalisation analytique du sérum en gradient de pH 4-6,5 a révélé que la bande Gc 1 n'était pas unique et présentait deux bandes dénommées Gc 1^S et Gc 1^F. Dès lors, on peut obtenir les phénotypes Gc 1-1 suivants : Gc 1^F-1^F, Gc 1^S-1^S et Gc 1^F-1^S.

Les phénotypes Gc les plus fréquemment décelés, en focalisation iso-électrique en gel de polyacrylamide en gradient de pH 4-6 ou 4-6,5, sont présentés ici :



L'immuno-empreinte permet de mettre en évidence les différents phénotypes Gc après focalisation iso-électrique en gel de polyacrylamide en gradient de pH 4-6 ou 4-6,5. Les bandes Gc 1 présentent les p*H*_i 4,86 et 4,93 mesurés avec une électrode de contact INGOLD (Type 10403 3002).

La bande Gc 2-2, par ailleurs, migre au p*H*_i 5,05.

Figure 1. Groupes G c.

Immuno-empreintes des principaux phénotypes G c 1

Le gel d'électrofocalisation analytique
est en gradient de pH 4-6

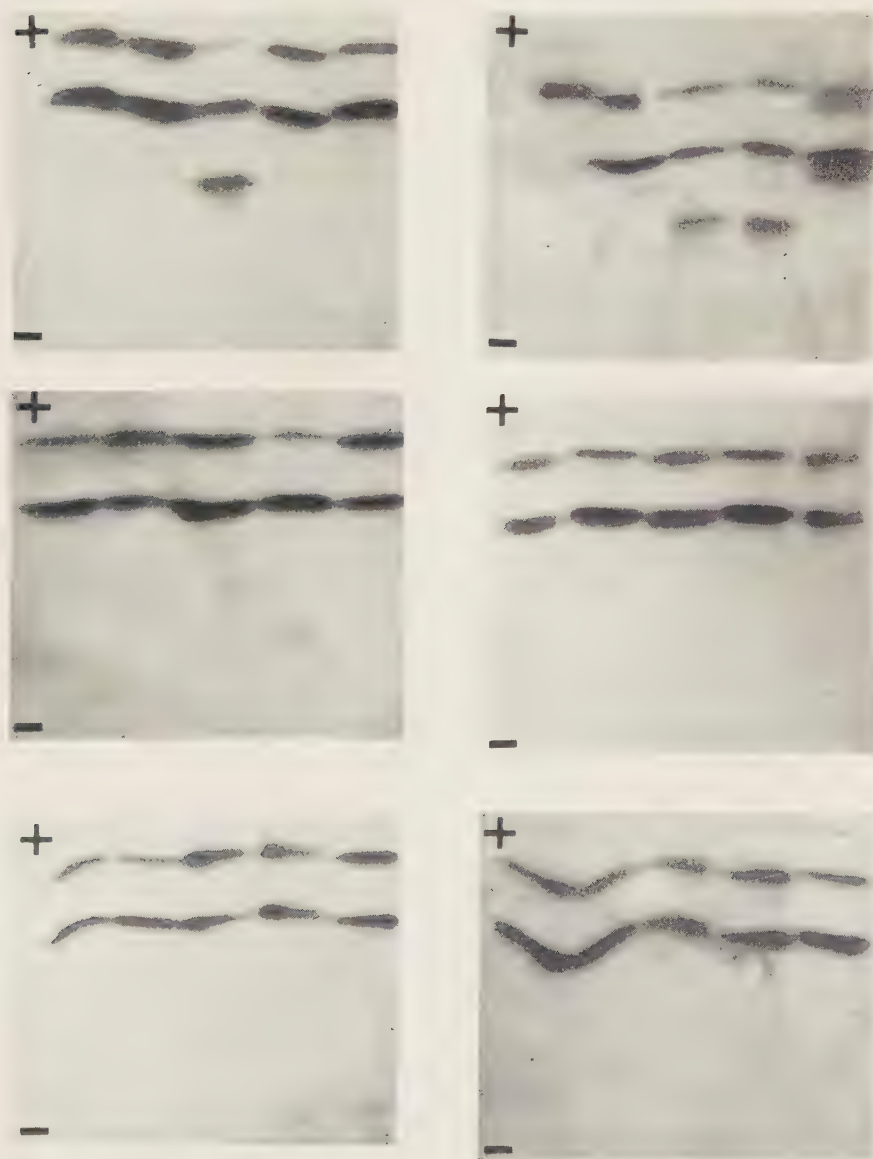
Les empreintes ont été effectuées sur
membrane acétate de cellulose Sephrapore III
(GELMAN)

avec antisérums anti-G c purs (DAKO)

La durée de contact gel-membrane : 1 h.

N.B. L'anode (+) est toujours située en haut de chacune
des six immuno-empreintes photographiées ci-contre.

Figure 1. Immuno-empreintes de phénotypes G c 1.



Nous avons également étudié par immuno-empreinte les interactions entre le phénotype Gc 1^S-1^S et les vitamines D₂, D₃ et 25OH D₃. Si l'on considère qu'une mole Gc s'unit à 2 moles de vitamine - quelle qu'elle soit -(1), les échantillons sériques contenant le phénotype Gc 1^S-1^S ont été simplement mis à incuber, 24 h. à 4°C, avec des quantités croissantes de vitamines D₂, D₃, 25 OH D₃ (ROUSSEL) dans les rapports molaires vitamine / Gc de 0, 0,5, 1, 2, 10.

Ces échantillons ont été ensuite analysés par focalisation iso-électrique en gradient de pH 4-6 - la durée de la migration était de 4 h. - suivie d'immuno-empreintes à l'aide d'un antiserum anti-Gc pur (DAKO) (Figure 2, p.131)

Un déplacement anodique des bandes habituelles du phénotype Gc a été observé avec les trois différentes vitamines D. Il faut noter que Van Baelen & coll.(2) n'ont pas noté de déplacement similaire des bandes Gc avec la vitamine D₃ même avec un excès 25 molaire de celle-ci. D'autre part, il a été démontré que la stabilité de la liaison Gc - vitamine D diminuait dans l'ordre suivant : 25 OH D₃, D₃, D₂ (1).

Il reste à comprendre comment la vitamine D, qui ne possède aucune charge électrique et ne migre donc pas en électrophorèse, peut induire un tel déplacement anodique des bandes des phénotypes Gc. Il semble que la liaison Gc - vitamines D entraînerait des modifications de la structure tertiaire de la protéine Gc et révélerait de ce fait, des résidus acides aminés ordinairement "masqués" dans la protéine isolée (3).

- (1) KAWAKAMI M., IMAWARI M., GOODMAN (De) W.S.,
Biochem. J. 1979, 179 : 413-423
- (2) Van Baelen H., BOUILLON R., DE MOOR P.
J. Biol. Chem. 1978, 253 : 6344-6345
- (3) SVASTI S., BOWMAN B.H.
J. Biol. Chem. 1978, 253 : 4188-4194

Figure 2. Phénotype Gc $1^S - 1^S$ et vitamines D 2 , D 3 , 25 OH D 3 .

Immuno-empreintes après incubation du Gc $1^S - 1^S$

Conditions d'électrofocalisation analytique :

gel de polyacrylamide en gradient de pH 4 - 6
durée de la migration 4 heures

Rapports molaires vit.D 2 / Gc = 0, 0,5, 1, 2, 10

Sérum humain contenant le Gc - Vitamines D
commerciales (ROUSSEL). Incubation 24h à 4°C.

Conditions des immuno-empreintes :

membranes acétate de cellulose Sepharose III
(GELMAN)

antisérum monospécifique Gc pur (DAKO)

N.B. L'anode est en haut des empreintes ci-contre

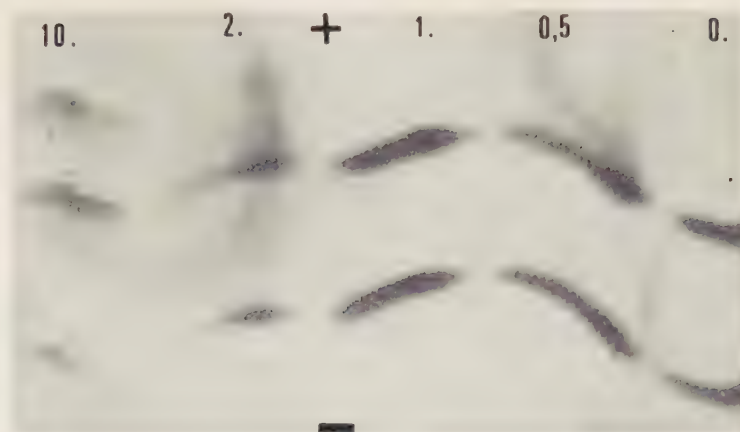
Les rapports molaires Vit D / Gc figurent en haut
des empreintes correspondantes.

La vitamine D liée au phénotype Gc $1^S - 1^S$ est précisée
à gauche de chaque photographie.

Figure 2. Gc 1-1 et vitamines D₂, D₃, 25 OH D₃.

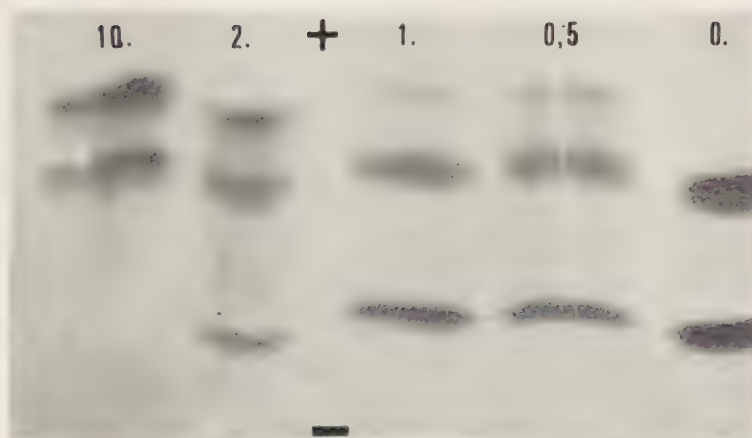
Rapports
molaires :

vit. D₂



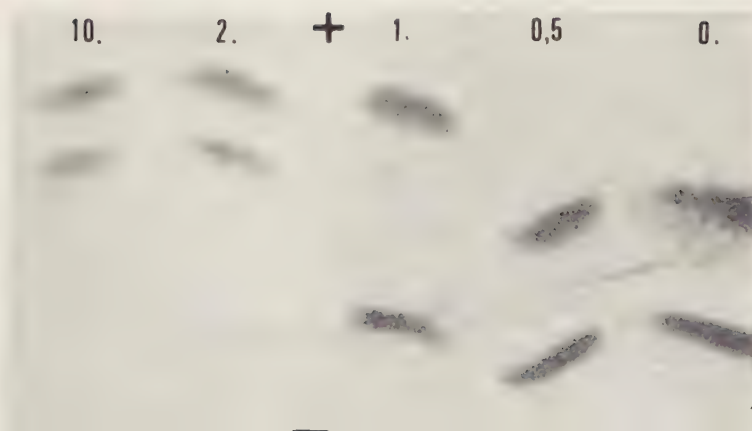
Rapports
molaires :

vit. D₃



Rapports
molaires :

vitamine
25 OH D₃



La Transferrine - Tf -

Récemment P. Kuhn1 (1) a décrit un polymorphisme de la transferrine humaine après focalisation iso-électrique en gradients de pH 3,5-9,5 et 4-6,5 suivie d'une immuno-empreinte. Nous avons vu cependant, Chapitre II, que le polymorphisme de la transferrine est connu depuis longtemps puisque 22 allèles au moins ont été décrits dès 1972 (Cf. Figure 5, p.55).

La figure ci-dessous schématise les différents phénotypes de la transferrine obtenus par P. Kühnl en gradient de pH 4-6,5 et 3,5-9,5. On remarquera que, pour un gradient de pH 4-6,5, l'auteur obtient moins d'information par immuno-empreinte que sur notre propre immuno-empreinte de la Figure (photographie) page 135. Nous précisons que nous avons personnellement utilisé des sérums frais et non des sérums congelés.



(1) KUHN1 P. In "Der forensischen Serologie" 1979,
(LKB Instrument, gmbh, Broma, Sweden).

La focalisation iso-électrique analytique en gradient de pH 4-6,5 suivie d'immunoprécipitation nous a donné pour la transferrine de sérums frais, cinq zones différentes, bien individualisées de la cathode à l'anode : Figure ci-contre.

Ces zones, ou "bandes", attirent les remarques suivantes :

- * la bande de pH_i 5,87 varie en intensité d'un individu à un autre ;
- * la bande à pH_i 5,60 est unique ou double et, dans ce cas, l'espace entre les deux varie d'un individu à l'autre ;
- * les deux bandes suivantes, l'une très intense pH_i 5,42 et l'autre moins dense pH_i 5,25, sont constantes dans tous les sérums étudiés ;
- * enfin, une à trois bandes, localisées dans la zone de pH_i 5,07 à 5,01 correspondent aux sous-types de transferrine décrits par P. Kuhn



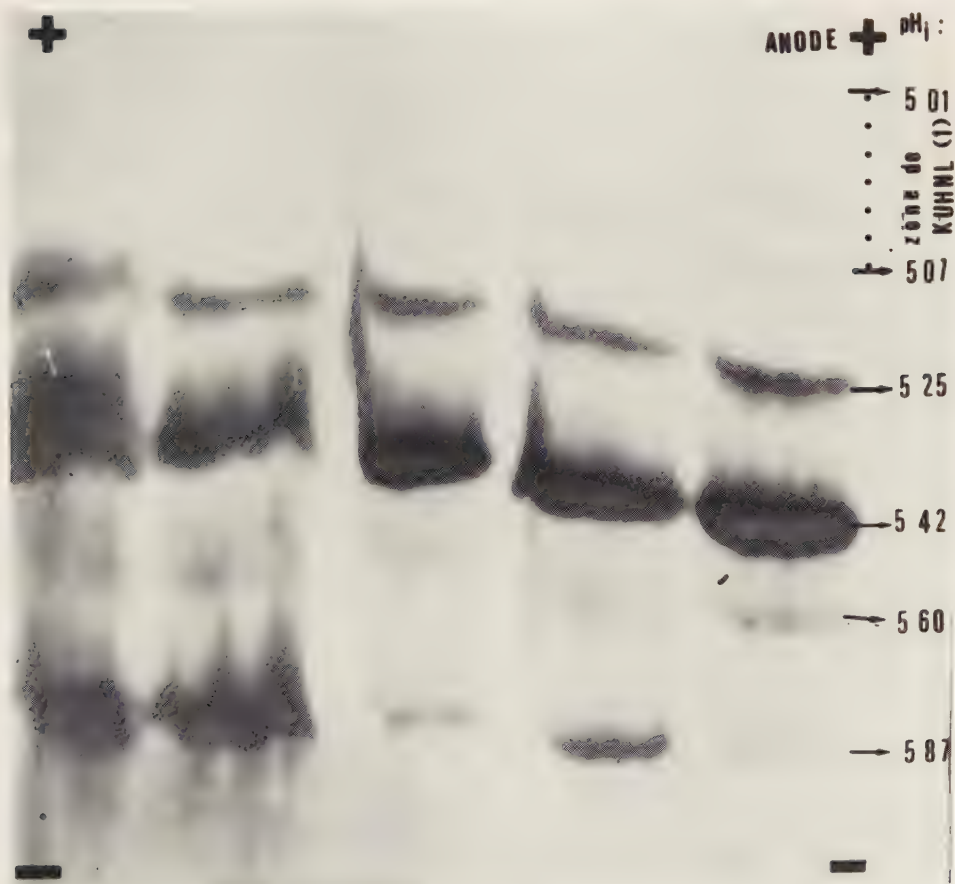
Figure (ci-contre) Immuno-empreintes de transferrine humaine.

L'électrofocalisation analytique a été effectuée avec des sérums frais en gel de polyacrlamide en gradient de pH 4-6,5

Les immuno-empreintes ont été effectuées sur membranes acétate de cellulose Sepraphore III (GELMAN) avec des antisérums anti-transferrine humaine purs (DAKO)

N.B. Les pH_i de chaque bande ont été mesurés avec une électrode de contact INGOLD type 10403 3002

Immuno-empreintes de phénotypes de la transferrine humaine (cinq sérums frais différents)



L'Haptoglobine - Hp -

L'haptoglobine présente, chez l'Homme, trois phénotypes principaux : Hp 1-1, Hp 2-2 et Hp 2-1. En 1969, M.K. Fagerhol a décrit, pour le phénotype Hp 1-1, divers variants - au moins trois - caractérisés par huit bandes protéiques en électrophorèse en gel d'amidon pH 4,9 (Cf. Chapitre II, p.57), mais ces bandes disparaissent quand l'acide borique présent dans le tampon est remplacé par d'autres acides.

Nous avons étudié par électrofocalisation analytique des phénotypes d'haptoglobine Hp 1-1, Hp 2-2 et Hp 2-1, en utilisant des gels de polyacrylamide de différents gradients de pH : 3,5-5, 4-6 et 4-6,5. Nous avons ensuite effectué des immuno-empreintes sur membranes d'acétate de cellulose ou sur films d'agarose.

Avec les phénotypes Hp 1-1, les résultats obtenus sont similaires à ceux de M.K. Fagerhol, bien que le nombre de bandes obtenu soit supérieur à huit (Figure 1.A.ci-après). Le fait suggère que les tracés obtenus par M.K. Fagerhol n'étaient pas dus à des complexes entre Hp 1-1 et ions borates quoique, dans notre expérience, l'existence d'associations ampholytes porteurs - Hp 1-1 au cours de la focalisation iso-électrique ne puisse, non plus, être écartée. Des études complémentaires sont nécessaires pour démontrer, dans le cas des phénotypes Hp 1-1, si les tracés sont génétiquement déterminés et peuvent être associés aux phénotypes Hp 1^F-1^F, Hp 1^S-1^S, Hp 1^F-1^S proposés par d'autres auteurs. En effet, nous avons vu Chapitre II (p.57) que la formule moléculaire de l'Hp 1-1 était $(\alpha_1\beta)_2$ avec un poids moléculaire voisin de 100.000 δ , la chaîne polypeptidique présentant deux sous-types α_1^F et α_1^S ("Fast" - "Slow").

Figure 1. A. & B.

Immuno-empreintes de cinq échantillons sériques différents de phénotypes Hp 1 - 1

Figure 1.A. Gel d'électrofocalisation analytique.

Conditions : gel de polyacrylamide
en gradient de pH 4 - 6
(AMPHOLINES L K B) 25 W 2 h.

Ci-contre : Anode en haut du gel

Remarquez que 10 bandes sont visibles
pour chacun des phénotypes 1 à 5(*)

(*) Ceci malgré ce fait que le gel photographié a été utilisé pour l'immuno-empreinte de la Figure B., lavé, puis coloré au bleu de Coomassie R 250.

Figure 1.B. Immuno-empreinte sur le gel A.(p.141)

Conditions d'obtention :
membrane d'acétate de cellulose
Sepraphore III (GELMAN)

Antisérum anti Hp 1 - 1 pur (DAKO)

page 141, Figure B. : les sérums sont numérotés
comme sur la Figure A. de 1 à 5.

On notera que le sérum 1 ne montre qu'une bande
les sérums 2,3,4 en montrent quatre
et le sérum 5 en présente huit.

N.B. Les gels et empreintes sont présentés à leurs dimensions réelles au laboratoire.

Figure 1.A. Gel d'électrofocalisation analytique
de 5 sérums contenant Hp 1-1.
(Dimensions réelles. 10 bandes par phénotype)

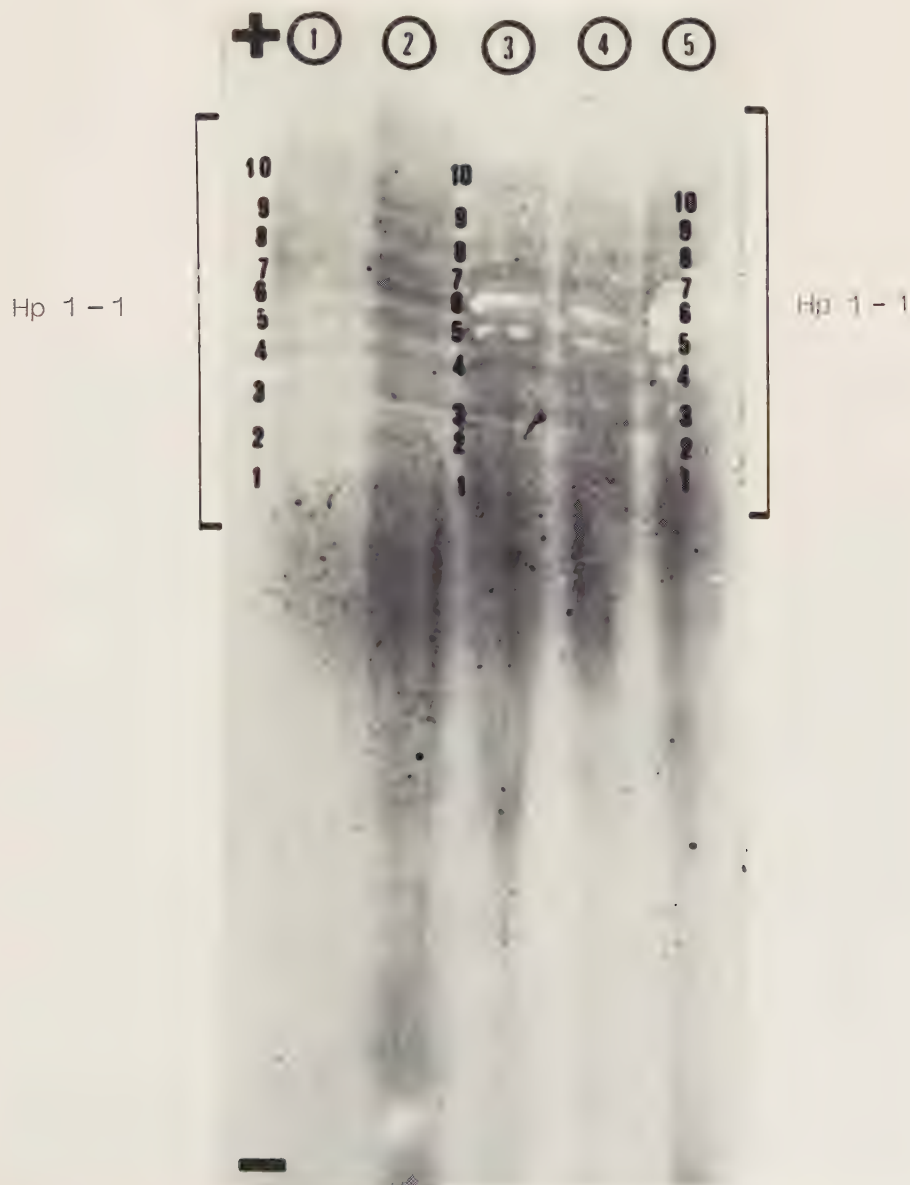
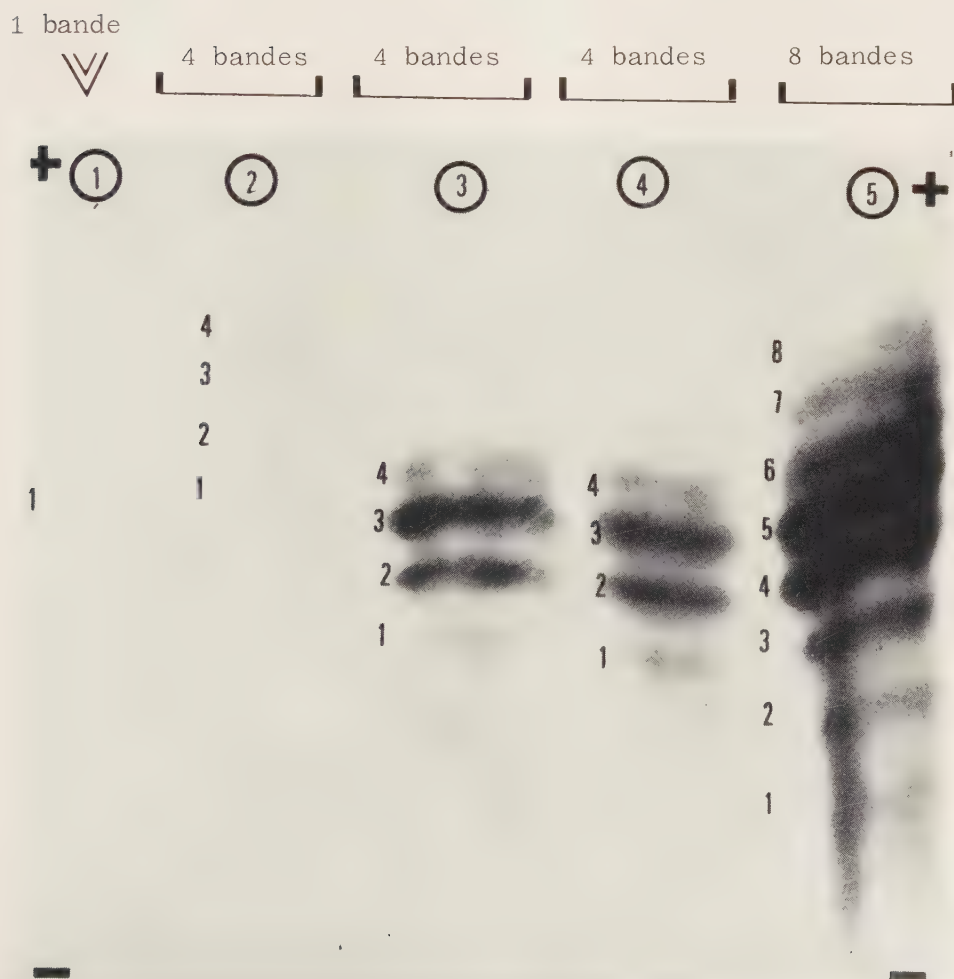


Figure 1.B. Immuno-empreintes sur acétate de cellulose de 5 sérums (Figure 1.A.) contenant Hp 1-1.

Les sérums, numérotés de 1 à 5 sont dans le même ordre que sur le gel d'électrofocalisation où; cependant, ils présentent 10 bandes chacun (Cf. p.137).

La membrane d'acétate est en grandeur réelle (7,5 x 2,5 cm).



Dans le cas des phénotypes Hp 1-2 et Hp 2-2, les poids moléculaires des espèces en présence sont, pour certaines tout au moins, supérieurs à 200.000 δ . La focalisation iso-électrique en gel de polyacrylamide est alors avantageusement remplacée par la focalisation iso-électrique en agarose (1). En gel en couche mince de polyacrylamide, en effet, des macromolécules de PM supérieurs à 200.000 δ ne donnent pas une focalisation iso-électrique excellente du fait de l'effet-filtre joué par le gel : l'agarose, à bas coefficient d'électro-endosmose, permet de résoudre ces problèmes.

(1) M. THYMAN In : "Electrophoresis 79", Munich 1979
Walter De Gruyter, Berlin, 1980

Figure 2. Application à 3 sérums contenant Hp 1-1
des deux types d'immuno-empreinte sur acétate de
cellulose (A.) et sur film d'agarose (B.)

(A.) : Immuno-empreinte obtenue sur acétate de
cellulose.

Gel d'électrofocalisation analytique en gradient de
polyacrylamide pH 4 - 6 (AMPHOLINES LKB)

Immuno-empreinte sur membrane d'acétate de cellulose
Sepraphore III (GELMAN)
avec antisérum anti-Hp pur (DAKO).

(B.) : Immuno-empreinte obtenue sur film d'agarose.

Gel d'électrofocalisation analytique en gradient de
polyacrylamide pH 4 - 6 (AMPHOLINES LKB)

* Technique d'obtention du film d'agarose :

Solution d'agarose (MILLS) 1 %
dans un tampon Barbitol/Barbitol sodique.

2 mL de cette solution à 45°C
sont coulés sur plaques de verre 75 x 25 mm
après addition de 40 μ L par mL de solution
de l'antisérum anti-Hp pur (DAKO).

Figure 2. Application comparée à Hp 1-1 d'immuno-empreinte sur acétate de cellulose et sur film d'agarose.



A. Immuno-empreinte
sur acétate de cellulose
après électrofocalisation
en polyacrylamide pH 4-6
(AMPHOLINES LKB)
Antisérum anti - Hp pur (DAKO)

B. Immuno-empreinte sur film
d'agarose (MILLS)

L'électrofocalisation
analytique est la même qu'en A.

Le phénotype Hp 1-1 du sérum (3)
est visible.

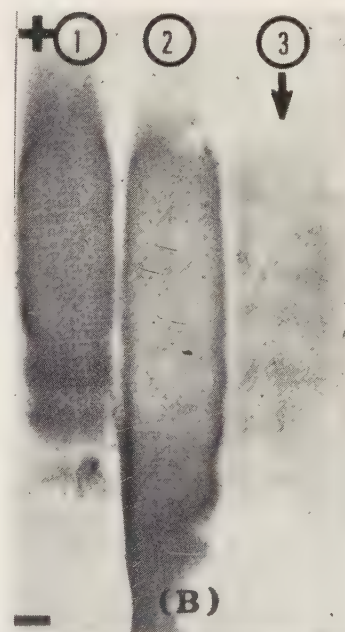
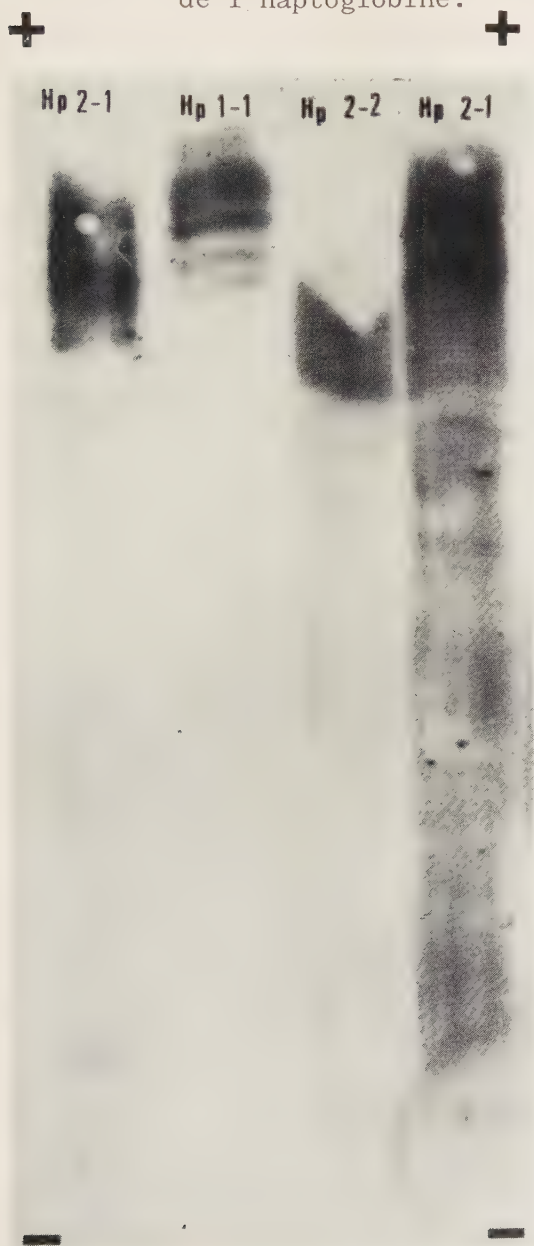


Figure 3. 4 phénotypes (4 sérums différents)
de l'haptoglobine.



Immuno-empreintes sur
acétate de cellulose
Sepraphore III (GELMAN)

après électrofocalisa-
tion analytique en poly-
acrylamide pH 4 - 6
(AMPHOLINES L K B)

L' $\alpha 1$ Antitrypsine - $\alpha 1$ AT -

L'électrofocalisation d'un sérum humain en gradient de pH 4-6 fournit trois zones bien individualisées en gel de polyacrylamide :

- une première zone, anodique, représente le système de l' $\alpha 1$ glycoprotéine acide (orosomucoïde) ;
- une zone centrale où l'on distingue les bandes caractéristiques de l' $\alpha 1$ antitrypsine ($\alpha 1$ AT) ;
- une zone de forte intensité, cathodique, qui correspond à l'albumine.

Dans la zone de l' $\alpha 1$ AT - ou système Pi - chaque phénotype homozygote est caractérisé par huit bandes protéiques numérotées de 1 à 8 en allant de l'anode vers la cathode. Les bandes 2, 4 et 6 sont les bandes ayant la plus forte intensité. Les phénotypes ne se distinguent entre eux que par la position des bandes les unes par rapport aux autres, d'une part, et leurs intensités relatives d'autre part.

Les phénotypes hétérozygotes sont caractérisés par seize bandes protéiques - huit bandes pour chacun des deux variants - : les intensités relatives de bandes et leurs positions doivent être comparées avec celles du phénotype homozygote de chacun des variants.

Nous avons vu, Chapitre II : Figure 10 (Cf.(*) les positions respectives en électrofocalisation analytique, en gel de polyacrylamide avec gradient de pH 4-6, des bandes protéiques des variants cathodiques et anodiques reconnus à ce jour. Il existe trois sous-types du variant M : M1 (Figure 10, Cf.(*)), M2, M3 ; M2 étant l'ancien "Mc" (ou M cathodique, ou M3 avec translation cathodique des 8 bandes protéiques) et M3, l'ancien MB, ou M2 avec une migration plus lente que M1 et plus rapide que M2.

(*) Nous reportons une seconde fois cette Figure 10 à la page 151 ci-après, pour faciliter la compréhension des problèmes et résultats techniques exposés ici.

* L'utilisation des techniques d'immuno-électrophorèse croisée et / ou d'immunofixation répond, pour l' α 1 AT à trois indications majeures :

1. ou bien les bandes caractéristiques du système Pi sont peu discernables d'autres bandes protéiques appartenant à des systèmes polymorphes différents ;
2. on suspecte le sérum d'être altéré,
3. ou, enfin, quand un nouveau phénotype semble être découvert.

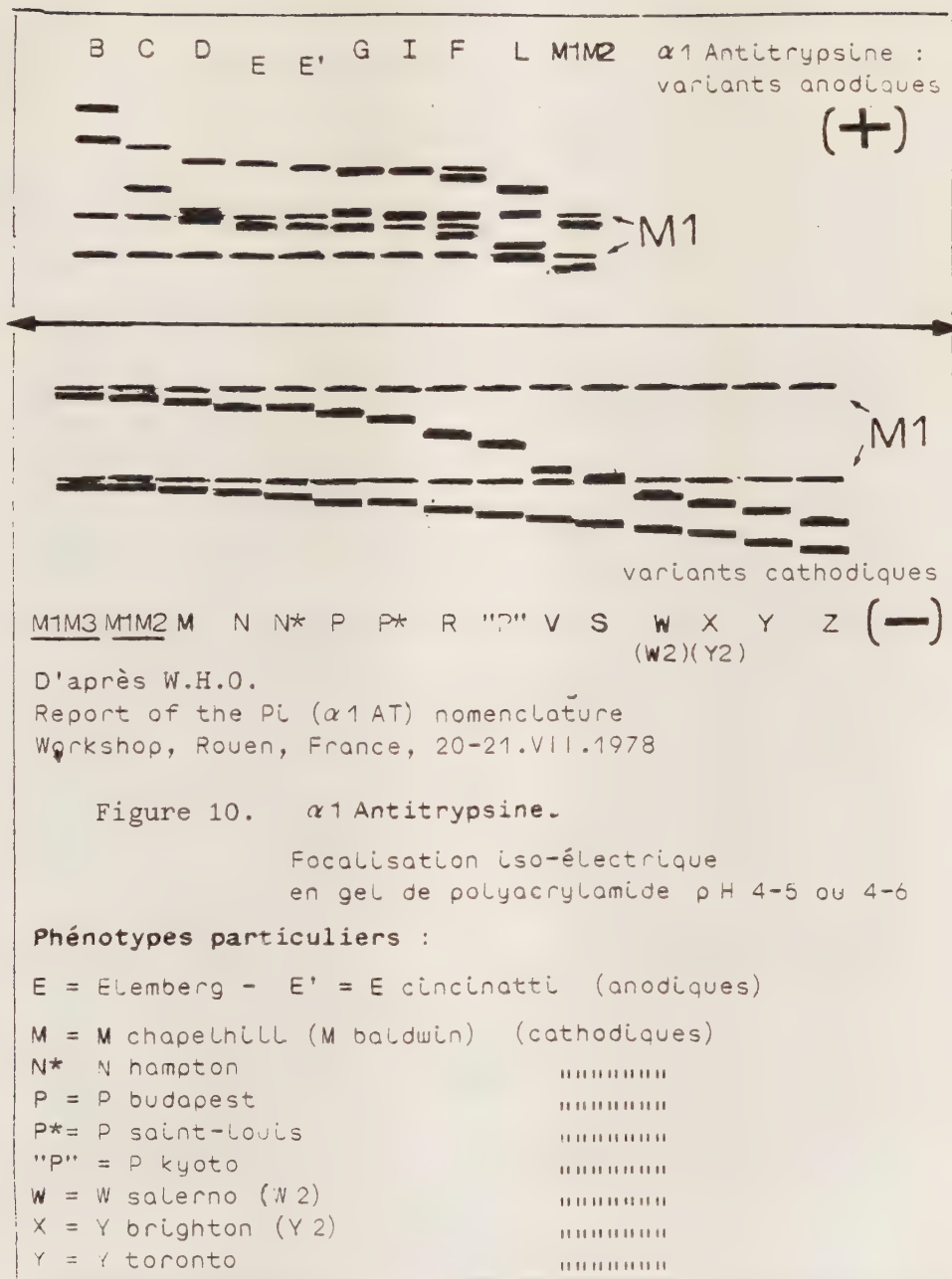
Quand cette dernière indication est posée, les recommandations du Comité International d'Etude du Système Pi (Pi System International Committee) sont les suivantes.

Chaque nouveau variant découvert est désigné par une lettre capitale dont la position, dans l'alphabet, doit rendre compte de la mobilité électrophorétique. Les positions relatives des nouveaux variants avec ceux connus, sont celles observées en électrofocalisation analytique en gel de polyacrylamide. S'il n'y a pas de lettre disponible pour désigner le nouveau variant, on peut associer le nom du lieu de découverte, ou des indices numériques, à la lettre du variant le plus proche du côté anodique du tracé d'électrofocalisation (Cf. Figure 10 ci-contre : Les "phénotypes particuliers").

Avant d'être défini comme tel, tout nouveau variant doit remplir les conditions suivantes :

- * avoir été trouvé à plusieurs reprises dans le même sérum ;
- * être confirmé par trois laboratoires spécialisés différents dont au moins un appartient au Comité ;
- * être dépisté au moins chez deux membres d'une même famille appartenant, si possible, à deux générations différentes ;
- * être laissé à la disposition des laboratoires du Comité International d'Etude sur le Système Pi.

Nous reproduisons Figures 1 et 2 ci-après, respectivement des immuno-électrophorèses croisées et des immuno-



empreintes des phénotypes, les plus fréquents de l' $\alpha 1$ AT.

L'immuno-empreinte a été utilisée également (1) pour, d'une part, l'étude de la désialylation de l' $\alpha 1$ AT effectuée sur un échantillon sérique et non sur la protéine purifiée. La désialylation par la neuraminidase se traduit par un déplacement cathodique des bandes protéiques caractéristiques du système Pi. D'autre part, l'immuno-empreinte a permis l'étude des interactions protéases - $\alpha 1$ AT : la trypsine, ou l'élastase, ont été incubées avec des échantillons sériques dans différents rapports molaires $\alpha 1$ AT / protéase. L'immuno-empreinte a été faite après focalisation iso-électrique analytique.

(1) Ph. ARNAUD " $\alpha 1$ AT, Biochemical, structural and genetic study", Ph.D Thesis, MEDICAL UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA, Charleston, USA, 1977.

Figure 1. Immuno-électrophorèses croisées
de l' $\alpha 1$ Antitrypsine.

Rappel : première dimension

- * focalisation iso-électrique
en gel de polyacrylamide gradient pH 3,5 - 6
(AMPHOLINES LKB)
durée 3 h. à 28 W.

deuxième dimension

- * migration après incorporation
d'une bande du gel d'électrofocalisation
(80 x 10 mm) dans un gel d'agarose (MILLS)
à 1% dans un tampon Barbitol/barbitol
sodique
Antisérums anti $\alpha 1$ AT (MELOY) 5 à 16 μ L
par mL de gel d'agarose (le volume d'anti-
sérums est variable selon le phénotype)
durée de migration : 12 h.
sous 10 mA 60 V.

Figure 1. Immuno-électrophorèse croisée de l' α 1AT.

A gauche : phénotypes "déficitaires"

A droite : phénotypes "normaux"

Focalisation iso-électrique pH 3,5-6 (AMPHOLINES LKB)

3h. 28 W. Antisérum anti α 1AT MELOY.

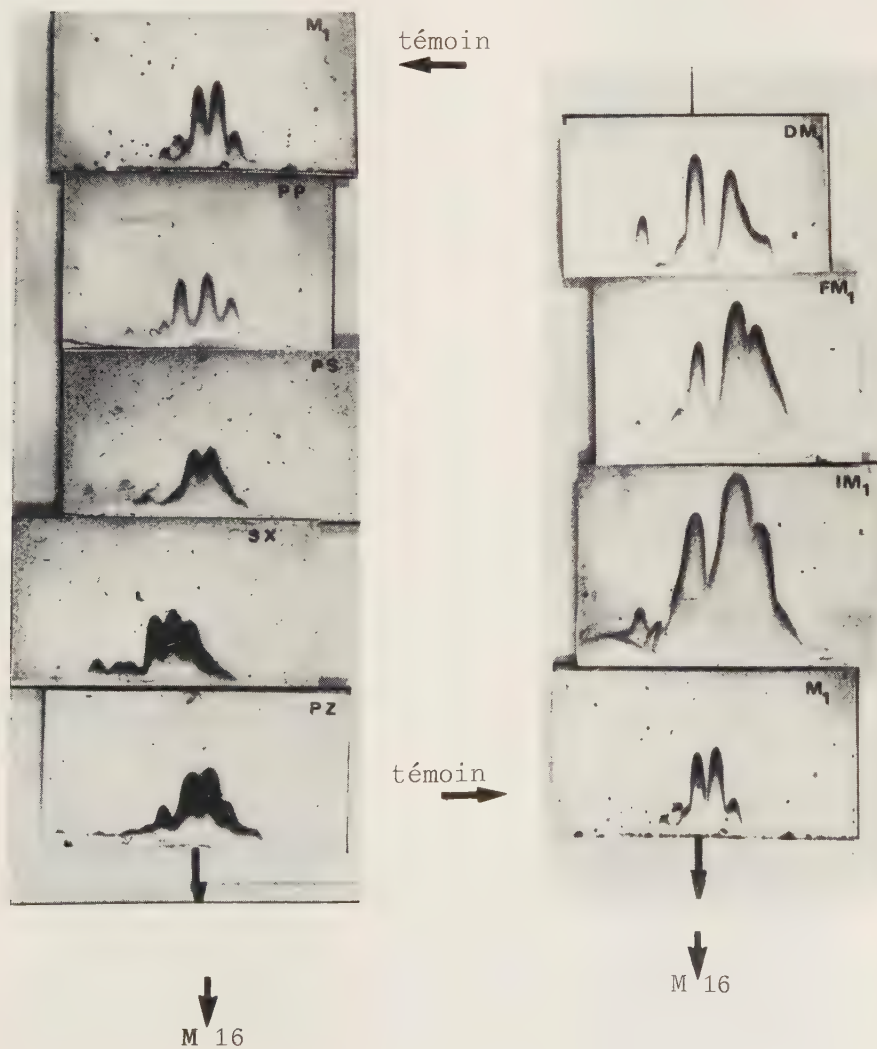
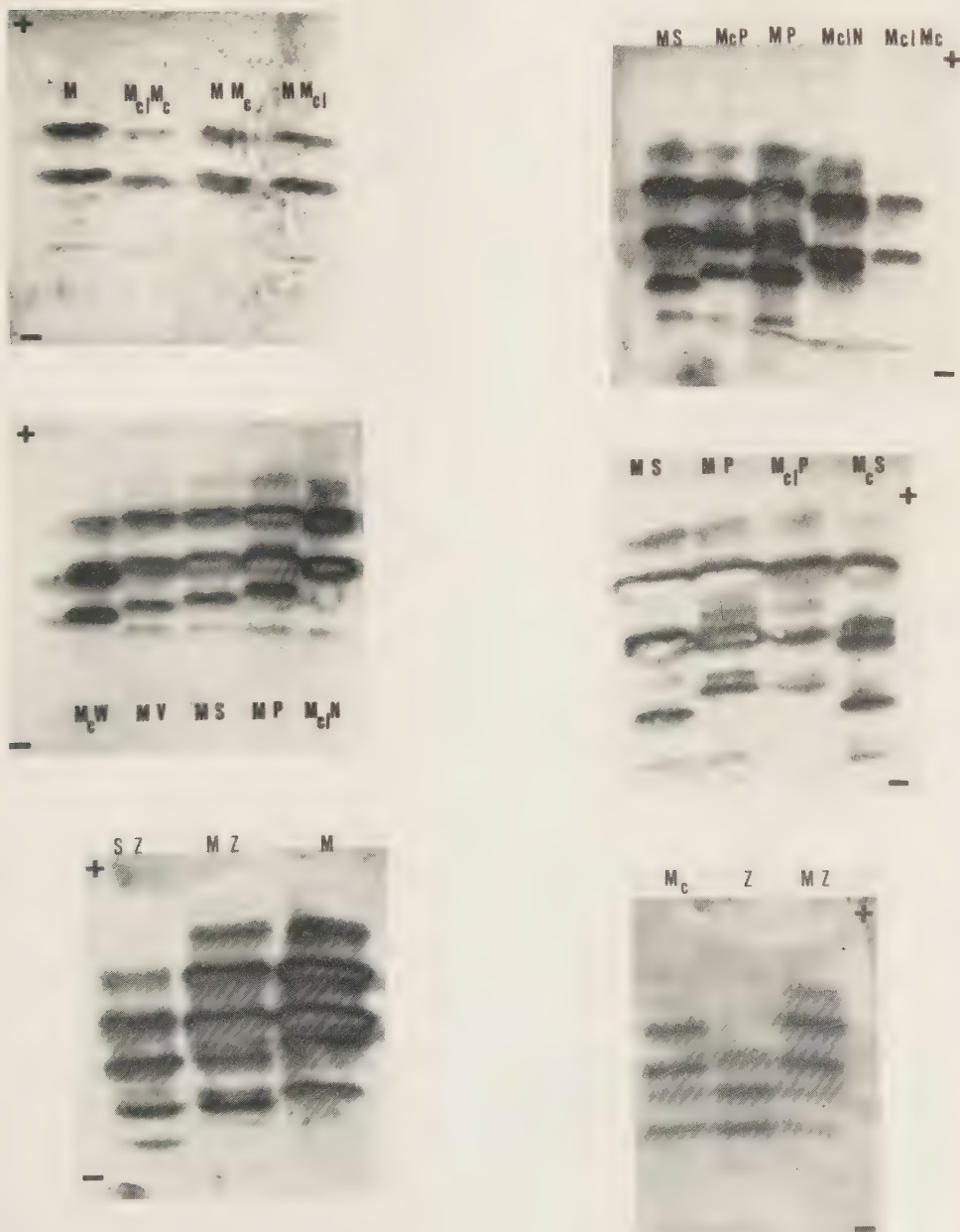


Figure 2. Immuno-empreintes de phénotypes d' $\alpha 1$ AT.

Les allèles M et Mc sont utilisés
comme témoins de phénotypes normaux ou déficitaires.



Chapitre IV

Discussion

* La détection spécifique d'un antigène dans un mélange complexe de protéines représente l'un des problèmes majeurs en biochimie analytique et en biochimie clinique. De plus, ce problème a pris une importance capitale avec l'introduction de techniques électrophorétiques hautement résolutive comme la focalisation iso-électrique. La première approche a été l'introduction, par Laurell, de l'immuno-électrophorèse croisée (1), mais celle-ci requiert un second temps d'électrophorèse, nécessite une quantité d'antisérum assez importante et, surtout, son inconvénient principal est un nombre réduit d'échantillons susceptibles d'être étudiés en un même temps. Cette technique, cependant, reste utile comme méthode de comparaison avec l'immunofixation.

* Puis, Alper et Johnson (2) ont proposé une technique simplifiée, appelée immunofixation en gels, dans laquelle l'antigène est précipité par l'antisérum spécifique. Cette technique, non seulement nécessite de larges quantités d'antisérum, mais, aussi, une diffusion de molécules d'anticorps dans le gel, diffusion difficile et qui s'associe à une diffusion de l'antigène dans le gel après la migration.

* Pour éliminer ces divers inconvénients, Ritchie et Smith (3) ont proposé d'appliquer l'antisérum sur le(s) gel(s) par l'intermédiaire d'un support solide, tel l'acétate de cellulose par exemple, préalablement imprégné par l'antisérum. Arnaud et al. (4,5,6) ont ensuite introduit une méthode dite de l'immuno-empreinte, qui prend avantage de la diffusion de l'antigène dans le support solide contenant l'anticorps spécifique. Dès lors, la diffusion de l'antigène se faisant plus rapidement que celle de l'anticorps, on conserve les avantages d'une technique électro-

phorétique très résolutive comme la focalisation iso-électrique.

* Il est intéressant ici, de discuter les différents temps de la technique de l'immuno-empreinte.

La technique électrophorétique utilisée :

→ Dans ce travail, la majorité des séparations analytiques a été réalisée après focalisation iso-électrique. De nombreux gradients de pH ont été étudiés. En immunofixation pour l'étude de la micro-hétérogénéité d'une protéine, la mesure du gradient de pH par micro-électrode de contact (INGOLD Ref 10403 3002) est nécessaire.

Les antisérums :

→ Trois paramètres importants les caractérisent :

1. la spécificité, ou mieux la monospécificité en ce qui concerne notre travail ;
2. le titre de l'antisérum ;
3. l'avidité de cet antisérum.

→ L'antisérum qui donne les meilleurs résultats en immunofixation peut être utilisé pur ou dilué. Dans la plupart des cas, nous avons utilisé la fraction immunoglobulinique des antisérums (Immunoglobulines de Lapin DAKO par exemple).

Les supports solides imprégnés de l'anticorps :

→ Deux techniques peuvent être employées.

→ L'antisérum imprègne des bandes d'acétate de cellulose (Sepraphore III, GELMAN) : pour éviter toute irrégularité à la surface de cette bande lors de son imprégnation, il importe de la mettre au contact de larges volumes d'antisérum et, une fois imprégnée, elle sera soigneusement séchée avant de l'appliquer sur le gel.

→ L'antisérum peut être inclus dans un film d'agarose 1% dans un tampon Barbitol : Barbitol sodique, pH 8.6. Ce gel est coulé, soit sur une plaque de verre, soit sur une feuille flexible de poly-éthylène. L'épaisseur du film est d'environ 1 mm : il doit être mis à équilibrer au moins 1 heure en chambre humide à la température ambiante.

→ Nous noterons que le contact gel d'agarose / gel d'électrophorèse est en règle excellent, et meilleur que celui obtenu entre acétate de cellulose / gel d'électrophorèse. D'autre part, la quantité d'antisérums nécessaire est réduite dans de notables proportions avec les films d'agarose : au moins dix fois comparativement à celles utilisées pour les membranes d'acétate de cellulose.

→ Enfin, les films d'agarose permettent l'usage des antisérums marqués par un radio-isotope (Iode 125 ou 131), le lavage des films d'agarose, après l'immunofixation, donnant un bruit de fond très réduit, contrairement à celui produit par les bandes d'acétate de cellulose (7).

→ Par ailleurs, avec un gel d'agarose imprégné de l'antisérum, il est possible, grâce au tampon Barbitol pH 8.6 de réaliser une immuno-empreinte d'une protéine à pH très acide - l'orosomucoïde, $\alpha 1$ glycoprotéine acide - ou très basique - comme certaines immunoglobulines -.

Les temps de contact gel d'électrophorèse / gel d'agarose, ou bandes d'acétate de cellulose :

→ Le temps de contact est déterminé empiriquement, en principe il est au plus égal à 1 heure. Cependant, dans de nombreux cas, nous avons trouvé un temps de contact de 15 mn largement suffisant, surtout avec les films d'agarose.

Par ailleurs, le contact entre membrane ou film et gel d'électrophorèse doit être absolument parfait, et surtout sans microbulles d'air.

Recherche des meilleures conditions de formation du Complexe Antigène - Anticorps sur support solide :

→ Toutes choses étant égales par ailleurs, deux paramètres sont d'une grande importance dans l'immuno-empreinte.

1. La concentration en Antigène, si elle est forte, - surtout en iso-électrofocalisation où l'antigène apparaît en bandes fines, et si pour un anticorps de dilution donnée, on reste loin du point d'équivalence, - la réaction antigène-anticorps de l'immuno-empreinte se réalise mal ou avec une redissolution des complexes antigènes-anticorps d'abord formés en présence de l'excès d'antigène. Dès lors,

la meilleure technique consiste, bien entendu, à diluer l'antigène sans modifier le titre de l'anticorps.

Mais, si la concentration en antigène est trop basse, - et si la protéine donne plusieurs bandes d'intensité inégale sur le tracé électrophorétique - il est possible de ne pas atteindre certaines bandes lors de l'immuno-empreinte. Le fait peut être minimisé en utilisant un film d'agarose.

2. Le titre de l'anticorps.

Un excès d'anticorps peut apporter une certaine redissolution des complexes antigène-anticorps, mais elle reste faible. L'excès d'antisérum est éliminé de toute façon lors des lavages successifs de l'immuno-empreinte avant sa coloration.

Lavage et Coloration - Décoloration des immuno-empreintes :

→ Les lavages de l'immuno-empreinte peuvent être effectués avec une solution NaCl 0,15 M, ou du PBS (Phosphate Buffer Saline), 0,1 M. Certains auteurs se contentent d'un simple lavage à l'eau. Toutefois, l'étape du lavage reste capitale car, si elle est insuffisante, l'étape suivante de la coloration puis décoloration sera médiocre, surtout si le colorant est le Bleu brillant Coomassie R 250 .



* La détection de protéines présentes dans le plasma, ou dans un mélange complexe, à des taux faibles inférieurs à 50 $\mu\text{g/ml}$, peut être réalisée par l'immuno-empreinte en y apportant les modifications suivantes : l'antisérum doit contenir des immunoglobulines marquées par un traceur isotopique et, dans ce cas, le support de choix de l'empreinte est le film d'agarose ; il importe, par ailleurs, de diluer convenablement l'antigène pour obtenir des conditions de formation du complexe antigène-anticorps optimales. La révélation de l'immuno-empreinte se fait ensuite comme une autoradiographie (7). Une alternative est le dépistage d'une protéine à faible concentration capable de se fixer sur un transporteur ("ligand") pouvant être marqué par un iso-

tope : par exemple les groupes Gc et la Vitamine D₃ marquée par le Tritium (H³) ou le Carbone 14 (C¹⁴). Le complexe antigène-anticorps de l'immuno-empreinte, dans de nombreux cas, n'empêche pas la liaison entre l'antigène protéique et son transporteur ("ligand") spécifique.

* Des réactifs immuno-enzymatiques peuvent être utilisés, que ce soit en technique directe ou indirecte, dite "sandwich", pour révéler les complexes antigènes-anticorps formés par immuno-empreintes. D'autres réactifs sont également utilisables : la Protéine A de la paroi de *Staphylococcus aureus* marquée à l'Iode 125, la fraction C1q du Complément marquée à l'Iode 125, des immunoglobulines anti-Ig marquées par un isotope. Ces différents réactifs sont utilisés sur supports solides. Certains auteurs, - mais en gels -, ont même employé des réactions d'hémolyse pour déceler des anticorps après focalisation iso-électrique (8).

* L'utilisation d'un film d'agarose contenant un réactif susceptible de se combiner à un second réactif contenu dans le gel d'électrophorèse n'est pas une méthode nouvelle. Les auteurs anglo-saxons et scandinaves parlent d'"overlay technique". Cependant, la grande majorité des chercheurs suivent la réaction dans le gel d'électrophorèse et non sur le film d'agarose, Narayan et Ray ont même proposé d'employer le film d'agarose de manière séquentielle (9).



* Les avantages de l'immuno-empreinte.

➡ Ils sont très nets comparativement à ceux de techniques comme l'immuno-électrophorèse croisée : une moindre consommation d'antisérum, pas de second temps électrophorétique, plusieurs échantillons peuvent être analysés simultanément.

En outre, l'immuno-empreinte est facile à mettre en oeuvre et, par sa reproductibilité et sa fidélité, se prête bien à l'étude du polymorphisme d'une protéine très précise au cours d'examens individuels pratiqués à grande échelle

et permet de dépister dans une population humaine - ou animale - des phénotypes rares d'une protéine donnée et de suivre la transmission génétique de ces derniers et, par là même de la protéine étudiée. Enfin, l'immuno-empreinte est un moyen d'étude des interactions spécifiques entre les protéines et certains "ligands" - Gc / Vit D ; TBG / T3 par exemple.

★ Les inconvénients de l'immuno - empreinte.

➡ Ils sont inhérents en partie à la définition même de l'immuno-empreinte : une protéine donnée, ou des fragments de cette protéine doués d'antigénicité vont réagir avec l'anti-sérum monospécifique.

Dès lors, l'immuno-empreinte ne donne pas d'informations sur l'état de la protéine en solution, elle ne renseigne que sur la conservation, ou non, de son antigénicité. Or une protéine peut être transformée au cours de son passage dans le plasma, ou même au cours de son excrétion après sa biosynthèse ; elle peut également présenter différentes formes moléculaires en solution - telles Hp2-2 et Hp2-1 -, toutes éventualités qui rendent l'interprétation des immuno-empreintes délicate.

La méthode électrophorétique utilisée dans le premier temps peut être malaisée sur certains supports pour certaines protéines : les exemples les plus classiques étant les IgM et l' α -2 macroglobuline qui ne peuvent être focalisées en couche mince de gel de polyacrylamide, quoique la focalisation analytique en gel d'agarose puisse permettre de résoudre ce problème (10).

Il faut d'ailleurs souligner que la technique de l'immuno-empreinte n'est applicable qu'immédiatement après la migration électrophorétique, en particulier la focalisation iso-électrique, un élargissement des bandes obtenues pouvant en effet résulter d'une diffusion de l'antigène dans le gel d'électrophorèse.



* La Quantification.

La quantification d'un antigène par la formation d'un complexe antigène-anticorps est l'un des problèmes majeurs de l'Immunochimie.

➡ L'immunofixation a été étudiée sur le plan quantitatif par Kahn et Thompson (11). Ils ont étudié différentes protéines du liquide céphalo rachidien après migration en gels d'acrylamide ($T = 1\%$; $C = 2,5\%$; Tris Glycine à pH 8,3) et immunofixation en gels d'acrylamide grâce à des membranes d'acétate de cellulose imprégnées d'antisérums spécifiques. Les tracés densitométriques des gels obtenus après coloration au bleu brillant Coomassie R 250, ou G 250, montrent une linéarité correcte entre les surfaces des pics et la concentration en antigène.

➡ Baumstark (12) a étudié les interactions élastase- $\alpha 1$ antitrypsine par immunofixation quantitative. Il utilise dans un premier temps une électrophorèse en agarose en tampon Barbitol pH 8,6, pour séparer l' $\alpha 1$ antitrypsine liée à l'élastase, le complexe présentant une mobilité électrophorétique intermédiaire entre celles des protéines natives. Le second temps est une immunofixation : l'anti-sérum spécifique - anti - $\alpha 1$ antitrypsine - est déposé à la surface du gel d'agarose par l'intermédiaire d'un papier WHATMAN n°1. Les gels sont mis à incuber en chambre humide 20 heures, puis lavés, séchés, et colorés. Les surfaces des zones de précipitation sont déterminées par planimétrie : l'auteur signale une limite de détection pour les protéines en présence : 0,25 mg / ml.

➡ Cependant, il n'a pas, à ce jour, été publié d'étude sur l'aspect quantitatif de l'immuno-empreinte, tant sur acétate de cellulose qu'en film d'agarose. Le seul obstacle à notre étude fut l'absence d'un densitomètre suffisamment performant pour distinguer quantitativement les différentes bandes fournies par l'immuno-empreinte d'une protéine précisée.

Une telle étude présenterait un double intérêt :

1. une quantification sur support solide après électrophorèse d'une protéine donnée : ce support serait archivable ;

2. la quantification des différentes bandes obtenues pour une protéine polymorphe microhétérogène et la comparaison des tracés densitométriques pour différents phénotypes.

Bibliographie

- (1. LAURELL, C.B.
Anal. Biochem., 10, 358-361, 1965
- (2. C.A. ALPER, A.M. JOHNSON
Vox Sang., 17, 445-452, 1969
- (3. R.F. RITCHIE, R. SMITH
Clin. Chem., 22, 497-499, 1976
- (4. P. ARNAUD, C. CHAPUIS-CELLIER, G.B. WILSON,
G.B. WILSON, J. KOISTINEN, R.C. ALLEN,
H.H. FUDENBERG
In : "Electrofocusing and Isotachophoresis" pp.265-272,
B.J. Radola & D. Graesslin, Editors
Walter De Gruyter, publisher, Berlin, N.Y., 1977
- (5. P. ARNAUD, G.B. WILSON, J. KOISTINEN,
H.H. FUDENBERG
J. Immunol. Methods, 16, 221-231, 1977
- (6. C. CHAPUIS-CELLIER, A. FRANCINA, Ph. ARNAUD
Immunofixation after electrofocusing : application to
the study of the micro-heterogeneity and polymorphism
of serum proteins.
In : "Electrophoresis 1979", Munich, 15-17 Oct. 1979
Walter De Gruyter publishers, Berlin/N.Y. (sous presse)
- (7. Y. LASNE, F. LASNE, O. BENZERARA, Ph. ARNAUD
Microheterogeneity and polymorphism of Thyroxine Binding
Globulin (TBG) : study in Human serum by Radio Print
Immunofixation.
In : "Electrophoresis 1979", Munich, 15-17 Oct. 1979
Walter De Gruyter publishers, Berlin / N.Y. (sous presse)

- (8. a. J.M. PHILLIPS, D.W. DRESSER
Europ. J. Immunol., 3, 738, 1973
- b. D.E. BRILES, J.M. DAVIE
J. Immunol. Methods, 8, 863, 1975
- (9. K.R. NARAYANAN, A.S. RAY
In : "Electrofocusing and Isotachophoresis" pp. 221-231,
B.J. Radola & D. Graesslin, editors,
W Walter De Gruyter, publisher, Berlin, N.Y., 1977
- (10. A. ROSEN, K. EK, P. ÅMAN^o
J. Immunol. Methods, 28, 1-11, 1979
- (11. S.N. KAHN, E.J. THOMPSON
Clin. Chim. Acta, 89, 253-265, 1978
- (12. J.S. BAUMSTARK
J. Immunol. Methods, 23, 79-89, 1978

Conclusion

Les techniques d'immunoprécipitation (ou immuno-empreinte) sont des méthodes analytiques de développement récent, visant à obtenir la formation de complexes antigène-anticorps sur un support solide. Le support solide imprégné d'antisérum spécifique est appliqué à la surface du milieu ayant servi à la migration électrophorétique. Dans le cas présent, la migration électrophorétique était une focalisation iso-électrique en couche mince de gel de polyacrylamide.

Cette technique nous a permis d'étudier le polymorphisme et la micro-hétérogénéité de quelques protéines humaines des gammopathies - immunoglobulines Ig A, Ig G, protéines de Bence-Jones et protéines de la maladie de Franklin - et de protéines humaines normales - Gc ("group components"), α_1 antitrypsine, transferrine, haptoglobine -, ces recherches étant effectuées dans le sérum humain total ou dans les urines non fractionnées.

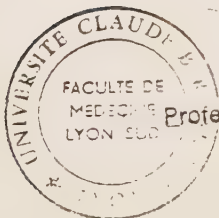
Les conditions optimales de résolution des immuno-empreintes impliquent le choix du meilleur rapport antigène/anticorps d'une part et, d'autre part, les meilleurs paramètres - physiques - du gel pour la protéine considérée.

Les avantages majeurs de l'immuno-empreinte résident dans sa simplicité. Elle permet en effet d'éviter un second temps d'électrophorèse - comme dans l'immuno-électrophorèse croisée de Laurell -, mais aussi elle permet l'identification immédiate d'une protéine si celle-ci a conservé son antigénicité.

En conclusion, la technique de l'immuno-empreinte s'est avérée très utile pour l'étude des hétérogénéités des protéines humaines, en particulier de leur déterminisme génétique, mais, en outre, pour la mise en évidence de la structure micro-hétérogène de certaines protéines humaines en dehors de tout polymorphisme.

Vu, le Doyen de la Faculté
de Médecine Lyon Sud

Le Président de la Thèse
(Nom et signature)
Professeur R. Creyssel



Vu et Permis d'imprimer
Lyon, le 8 MAI 1980

Le Président de l'Université Claude Bernard
Président du Comité de Coordination des
Etudes Médicales

